

発明の名称

塩基種判別方法、塩基種判別用プライマー及びキット

発明の背景

発明の分野

【0001】

本発明は、核酸の塩基配列中の所望の塩基種を判別する方法およびそれに用いるプライマーおよびキットに関する。

背景技術の説明

【0002】

2001年2月に、国際ヒトゲノムプロジェクトと米国のセレーラ社とから、ヒトゲノムのドラフトシーケンスが公開された。このことは、特に医療分野において非常に重要な出来事であった。しかし、ヒトゲノムのドラフトシーケンスが直ちに我々の生活や医療において活かされるわけではない。公開されたドラフトシーケンスは、あくまでもおおまかにヒトゲノムの塩基配列を決定した結果に過ぎず、個々の遺伝子の機能、およびそれらに基づく様々な病気のメカニズムの解明は今後の大きな課題である。そこで現在、最も注目されているのが、DNAのSNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) である。

【0003】

SNPは、同種個体間で最も多く観察される遺伝子多型であり、具体的にはゲノムDNAの塩基配列中のある特定部位に観察される一塩基対の相違（置換）である。SNPは、数百〜一千塩基対に1箇所の割合で存在していると推測されている。

【0004】

SNPは、病気のかかりやすさ、特定の薬剤に対する応答性、および副作用などに関連する遺伝子を探索する際の非常に有用な多型マーカーである。また、SNPの中には、遺伝子発現調節に影響を及ぼすものがある。例えば、DNAの塩基配列中のSNPを含む部分に対応するタンパク質中のアミノ酸の変化は、そのタンパク質の働きに影響を与え、その結果、他の遺伝子産物の質的異常や量的異常につながることもある。このような場合、SNPそのものを、病気のかかりやすさ、特定の薬剤に対する応答性、および副作用などの個人差の判定に利用することができる。

【0005】

従って、SNPの探索や研究を行なうことは非常に重要である。現在わが国においても、五大疾患に関連するSNPの探索・研究が特に盛んに行なわれている。これらのSNPの探索・研究の結果は、3〜5年後に実際の医療に利用され始め、臨床の場等で我々自身のSNPが診断されるようになると考えられる。そこで、各個人におけるSNPパターンを解析する、いわゆるSNP部位の塩基種の判定技術（以下、SNPタイピング技術と称する）が非常に重要視されている。

【0006】

またSNPとは異なるが、ゲノムDNAの塩基配列中のたった一塩基対の突然変異が重篤な疾病につながる例が知られている。従って、このような一塩基対の置換の有無を判定することもまた非常に重要になってきている。SNPタイピング技術は、このような一塩基対の置換の有無の判定においても有効な技術である。

【0007】

現在、様々なSNPタイピング技術が開発あるいは既に実施されている。それらの技術のうち、最も簡便な技術の1つでは、プライマー伸長反応を利用する。この技術では、標的核酸のSNP部位に隣接する塩基配列に対して相補的な塩基配列を有し、標的核酸のSNP部位の塩基種に応じて伸長反応の進行に差を生じさせるプライマー（以下、タイピングプライマーと称する）を用い、プライマー伸長反応の進行の差を判定することによって、SNPタイピングを行なう。

【0008】

多くの場合、上述のようなタイピングプライマーのプライマー伸長反応の進行の差の解析には、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCR、LAMPおよびTMA反応等の標的の塩基配列を増幅する反応を利用する。上記の反応の後、電気泳動等の方法によって標的の塩基配列の増幅の程度を解析することによって、SNP部位のタイピングを行なう。具体的には、以下に、標的の塩基配列を増幅する反応としてPCR反応を用い、その後電気泳動によってプライマー伸長反応の進行の差を解析する場合を、図1、図2および図3を参照しながら説明する。

【0009】

まず、図1(a)に示す工程で、SNP部位S1を有する標的のDNA1を含む試料溶液を調製する。続いて、DNA1を含む試料溶液に、タイピングプライマー7a、リバープライマー7b、DNAポリメラーゼ8および4種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸（以下、dNTPsと略記（ここで、N=A（アデニン）、C（シトシン）、G（グアニン）、T（チミン）））を添加する。ここで、タイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bは、二本鎖のDNA1を形成する互いに相補的な一本鎖のDNA3およびDNA4の一部に対して、それぞれ相補的である。一本鎖DNA3上のSNP部位S1に位置する塩基はチミン（T）（相補鎖DNA4の対応する塩基はアデニン（A））である。同様に、図2(a)に示す工程で、SNP部位S2を有する標的のDNA2を含む試料溶液を調製する。続いて、DNA2を含む試料溶液に、タイピングプライマー7a、リバープライマー7b、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPsを添加する。ここで、タイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bは、二本鎖のDNA2を形成する互いに相補的な一本鎖のDNA5およびDNA6の一部に対して、SNP部位S2を除き、それぞれ相補的である。一本鎖DNA5上のSNP部位S2に位置する塩基はシトシン（C）（相補鎖DNA6の対応する塩基はグアニン（G））である。なお、実際のゲノムDNA等では無数のSNP部位が存在するが、ここではDNA1およびDNA2のうちのタイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bが結合する領域において、DNA1のSNP部位S1を除く部分と、DNA2のSNP部位S2を除く部分とは、全く同じ塩基配列であるものとする。

【0010】

次に、図1(b)に示す工程で、DNA1を熱変性などによって一本鎖DNA3および4とする。同様に、図2(b)に示す工程で、DNA2を熱変性などによって一本鎖DNA5および6とする。

【0011】

次に、図1(c)に示す工程で、タイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bが、一本鎖DNA4および一本鎖DNA3にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー7aは、一本鎖DNA4のSNP部位S1（ここでは、アデニン（以下Aと記す））から3'末端側の領域に完全にハイブリダイズする。一方、図2(c)に示す工程でも同様に、タイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bが、一本鎖DNA6および一本鎖DNA5にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー7aは、その3'末端の塩基T以外が、一本鎖DNA6のSNP部位S2（ここでは、グアニン（以下Gと記す））よりも3'末端側の領域にハイブリダイズする。

【0012】

次に、図1(d)に示す工程で、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。SNP部位S1がAである一本鎖DNA4にタイピングプライマー7aは完全にハイブリダイズしているので、プライマー伸長反応が進行し、DNAポリメラーゼ8によってdNTPsが消費される。

【0013】

一方、図2(d)に示す工程でも同様に、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。しかしながら、SNP部位S2がGである一本鎖DNA6にタイピングプラ

イマー7aの3'末端の塩基Tのみハイブリダイズできない状態になっている。このため、プライマー伸長反応が正常に進行しにくい。

【0014】

図3は、上記図1および図2に示した工程の後、それぞれの反応溶液に含まれるDNA断片を電気泳動によって解析した図である。図1の場合では、タイピングプライマー7aからのプライマー伸長反応が良好に進行するため、所望の塩基配列を示すバンドが、図3のレーン1に示すように矢印Aで示される位置に検出される。一方、図2の場合では、タイピングプライマー7aからのプライマー伸長反応の進行が非常に悪いため、所望の塩基配列を示すバンドは、図3のレーン2に示すように矢印Aで示される位置にほとんど確認されない。この結果から、SNP部位S1の塩基種をタイピングすることができる。

【0015】

上述のように、タイピングプライマーを用いたSNPタイピング技術は、特に困難な操作や特殊な装置を必要としないので、現在知られているSNPタイピング技術の中でも最も有効な技術の一つと考えられている。しかしながら、タイピングプライマーを用いたSNPタイピング技術では、タイピングプライマーの設計が最も重要である。タイピングプライマーには、SNP部位の塩基種に応じてプライマー伸長反応の進行の差が、明確かつ再現性よく現れるように設計されている必要がある。従って、プライマー伸長反応の進行の差が、より明確かつ再現性よく現れるタイピングプライマーの開発が盛んに行われている。

【0016】

最も代表的なタイピングプライマーは、上記図1および図2に示したタイピングプライマー7aのように、一本鎖の標的核酸のSNP部位の3'側に隣接する塩基配列と、完全にハイブリダイズし、且つ、タイピングプライマーの3'末端塩基の種類と、一本鎖の標的核酸のSNP部位の塩基の種類との関係によって、プライマー伸長反応の進行に差が生じるように設計されている。

【0017】

しかし、上記図1および図2に示した方法で用いるタイピングプライマーは正確なSNPタイピングにおいては十分ではない。図2(c)に示すように、タイピングプライマーの3'末端の塩基が、SNP部位S2にハイブリダイズできない状態となっても、反応温度や時間の条件を厳密に制御しなければ、プライマー伸長反応が、タイピングプライマーが完全にハイブリダイズする場合と同様の効率で進行することがある。このような場合、正確なSNPタイピングは不可能となる。

【0018】

そこで、最近では、標的核酸の特定の配列の領域に相補的な配列を含み、その3'末端が標的核酸のSNP部位に対応し、3'末端から2塩基目に標的核酸配列と非相補的な塩基を有するタイピングプライマー(【0007】段のタイピングプライマーと厳密には違うものだが、役割は同じものなので、これもタイピングプライマーと称する)が開発されている(例えば、特開2002-101899号公報)。この技術では、タイピングプライマーのSNP対応部位の塩基が、標的核酸のSNP部位の塩基と相補的である場合には、3'末端が標的核酸にハイブリダイズし得、プライマー伸長反応が進行する。一方、タイピングプライマーのSNP対応部位の塩基が、標的核酸のSNP部位の塩基と相補的でない場合には、タイピングプライマーの3'末端の塩基と3'末端から2番目の塩基という2つの塩基が、標的核酸と非相補的になるため、プライマー伸長反応が、上記図2(c)で示した場合よりもさらに進行しにくい状況となる。そのため、プライマー伸長反応が進行する場合と、しない場合との区別がより明確になり、より正確なSNPタイピングが可能となると報告されている。

【0019】

さらに、最近開発されたタイピングプライマーとして、東洋紡績(株)によって開発されたASP(A l l e l e S p e c i f i c P r i m e r)がある(国際公開第01/042498号パンフレットを参照)。ASPの3'末端塩基は、標的核酸の標的のS

NP 部位の 5' 側に隣接する塩基と相補的であり、ASP の 3' 末端から 2 番目の塩基が標的核酸の標的の SNP 部位に対応しており、さらにその 3' 末端から 3 番目の塩基が標的核酸の塩基に対して非相補的であるように設計されているプライマーである。ASP を、校正活性の強い α 型 DNA ポリメラーゼとともに用いて、プライマー伸長反応を行なうことによって、上述の図 1 および図 2 に示した方法よりも SNP 部位の塩基種の判別を正確に行なうことができると報告されている。

【0020】

具体的には、図 1 および図 2 に示す方法において、タイピングプライマー 7 a の代わりに ASP を用い、DNA ポリメラーゼ 8 として校正活性の強い α 型 DNA ポリメラーゼを用いてプライマー伸長反応を行なう。このとき、図 4 (a) に示すように、ASP 100 の 3' 末端から 2 番目の塩基 (T) と一本鎖 DNA 4 の SNP 部位 S1 の塩基 (A) とが相補的である場合、良好にプライマー伸長反応が進行する。一方、図 4 (b) に示すように、ASP 100 の 3' 末端から 2 番目の塩基 (T) と一本鎖 DNA 6 の SNP 部位 S2 の塩基 (G) とが相補的でない場合には、ASP 100 の 3' 末端から 2 番目と 3 番目の塩基という 2 つの塩基が標的核酸に対して相補的でないことになり、プライマー伸長反応がほとんど進行しないとされている。その結果、プライマー伸長反応の進行の差が、上記図 1 および図 2 に示した方法に比べて大きくなると報告されている。

発明の概要

【0021】

本発明は、核酸中の所望の塩基の種類をさらに正確に且つ再現性よく判別するための塩基種判別方法ならびにそれに用いるプライマーおよびキットを提供する。

【0022】

本発明は、1 つの局面において、標的核酸における一塩基の置換領域の塩基種を判別する方法を提供する。この塩基種判別方法は、(a) 一塩基の置換領域を有する二本鎖の標的核酸と、塩基種判別用プライマーと、DNA ポリメラーゼと、dNTPs とを含む溶液を調製する工程と、(b) 上記溶液中において、上記塩基種判別用プライマーを上記標的核酸にハイブリダイズさせ、上記塩基種判別用プライマーを始点とするプライマー伸長反応を進行させる工程と、(c) 上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することによって、上記置換領域の塩基種を判別する工程とを含み、ここで、上記塩基種判別用プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その 3' 末端が上記標的核酸のいずれか一方の鎖の上記置換領域に対応するように当該一方の鎖にハイブリダイズすることが可能な第一の一本鎖核酸からなり、当該第一の一本鎖核酸は、上記標的核酸の上記一方の鎖の上記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である塩基からなる 3' 末端に位置する置換対応領域と、上記置換対応領域の 5' 側に隣接し、かつ上記標的核酸の上記一方の鎖に対して非相補的な少なくとも 2 つの塩基からなる非相補領域と、上記非相補領域の 5' 側に隣接し、かつ上記標的核酸の上記一方の鎖に対して相補的な相補領域であって、少なくとも上記置換領域の塩基と上記置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合に当該第一の一本鎖核酸が上記プライマー伸長反応の可能な条件下で上記標的核酸の上記一方の鎖にハイブリダイズするのに十分な数の塩基からなる相補領域とからなることを特徴とする。なお、上記置換対応領域は、一塩基からなることが最も好ましく、上記非相補領域は、二塩基からなることが最も好ましく、そして上記相補領域は、5 以上の塩基からなることが好ましい。

【0023】

本発明の塩基種判別方法では、塩基種判別用プライマーを、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に作用させた場合、相補領域は、一本鎖の標的核酸にハイブリダイズする。また、非相補領域は、一本鎖の標的核酸にハイブリダイズすることができない。置換対応領域の塩基が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基に相補的である場合、置換対応領域は一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズする。一方、置換対応領域の塩基が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基に非相補的である場合、置

換対応領域は一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズできない。

【0024】

一本鎖の標的核酸に対して、塩基種判別用プライマーの非相補領域が離間した状態となるものの、置換対応領域が一本鎖の標的核酸にハイブリダイズしている場合、3'末端から核酸を伸長させる酵素であるDNAポリメラーゼが、塩基種判別用プライマーの3'末端に正常に作用できる状態となる。

【0025】

これに対して、一本鎖の標的核酸に対して、塩基種判別用プライマーの非相補領域および置換対応領域がいずれもハイブリダイズできず、一本鎖の標的核酸に対して非相補領域および置換対応領域が離間した状態となった場合、DNAポリメラーゼが、塩基種判別用プライマーの3'末端に正常に作用できない。

【0026】

このため、置換対応領域の塩基が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基と相補的であり、一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズする場合、プライマー伸長反応は良好に生じる。しかし、置換対応領域の塩基が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基と非相補的であり、一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は良好に生じない。

【0027】

従って、一本鎖の標的核酸の置換領域と塩基種判別用プライマーの置換対応領域とが相補的である場合と、一本鎖の標的核酸の置換領域と塩基種判別用プライマーの置換対応領域とが非相補的である場合との間での、プライマー伸長反応の進行の差が明確に生じる。

【0028】

したがって、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基の塩基種を正確に判別することができる。本発明はまた、標的核酸の置換領域において二塩基以上の置換が存在する場合にも、適用し得る。

【0029】

上記DNAポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いことが好ましい。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いDNAポリメラーゼを用いると、塩基種判別用プライマーの置換対応領域が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基と非相補的な塩基を有しており、一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合にも、置換対応領域および非相補領域のヌクレオチドを切断した後に、プライマー伸長反応を進行させてしまう、ということがなくなる。従って、標的核酸の置換領域の正確な塩基種の判別が不可能となるおそれが解消される。

【0030】

上記塩基種判別用プライマーは、DNAであることが好ましい。DNAは、化学的に非常に安定であり、取り扱いも簡単で、入手も容易だからである。

【0031】

本発明の好ましい実施形態では、上記工程(a)では、上記溶液中に、上記二本鎖の核酸のうちの他方にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなるリバースプライマーをさらに含み、上記工程(b)では、上記プライマー伸長反応を、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCR、LAMPおよびTMAからなる群から選択されるいずれか1つの塩基配列増幅方法を用いて進行させてもよい。さらに、上記工程(c)では、これらの塩基配列増幅方法を用いて進行させたプライマー伸長反応の進行の差に基づいて、前記置換領域の塩基種を判別し得る。

【0032】

好ましくは、上記工程(c)では、上記塩基配列増幅法によって増幅された塩基配列の増幅量を、電気泳動法、質量分析法および液体クロマトグラフィーからなる群から選択されるいずれか1つの方法で測定することによって、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析する構成としてもよい。

【0033】

好ましくは、上記工程（c）では、プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸の量を測定することによって、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析する構成としてもよい。

【0034】

好ましくは、上記工程（c）では、プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸の量を測定することによって、上記塩基配列増幅方法によって増幅された塩基配列の増幅量を測定する構成としてもよい。

【0035】

好ましくは、上記工程（c）では、上記塩基配列増幅法によって増幅された塩基配列の増幅量を定量的に解析することによって、上記置換領域の塩基種を判別する構成としてもよい。このような定量的な解析は、特に、置換領域の塩基が父親由来の遺伝子と母親由来の遺伝子とで同じである（ホモ）か、あるいは異なる（ヘテロ）かを判別するのに適している。

【0036】

より好ましい実施形態では、上記ピロリン酸の量の測定は、工程（b）からの上記溶液の少なくとも一部を含む試料中で、ピロリン酸を無機リン酸に変換する工程、上記試料を、グリセルアルデヒド3-リン酸、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、および電子メディエータを含む測定系に供する工程、および、上記測定系において、生成される電流値を測定する工程を包含し、ここで、上記電流値は、上記試料中のピロリン酸の濃度を示す。

【0037】

好ましくは、上記電子メディエータは、フェリシアン化物、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーからなる群より選択される少なくとも一種である。さらに好ましくは、上記測定系はジアホラーゼをさらに含む。

【0038】

好ましくは、上記ピロリン酸の無機リン酸への変換は、上記試料中でピロリン酸をピロホスファターゼと反応させることによって行われる。

【0039】

さらに別の好ましい実施形態では、上記ピロリン酸の量の測定は、工程（b）からの上記溶液の少なくとも一部を含む試料を、 H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された少なくとも2つの領域を有する測定系の一方の領域に配置させる工程、および上記測定系において、上記少なくとも2つの領域のいずれかにおいて H^+ 濃度の変化を測定する工程を包含し、上記 H^+ 濃度の変化の程度が、前記試料中のピロリン酸の濃度を示すことを特徴とする。

【0040】

さらに別の好ましい実施形態では、上記ピロリン酸の量の測定は、工程（b）からの上記溶液の少なくとも一部を含む試料を、 H^+ -ピロホスファターゼを膜内に有する人工または天然の膜小胞を含む測定系に供する工程、および上記測定系において、上記膜小胞内側または前記膜小胞外側における H^+ 濃度の変化を測定する工程を包含し、上記 H^+ 濃度の変化の程度が、上記試料中のピロリン酸の濃度を示すことを特徴とする。 H^+ -ピロホスファターゼを上記測定系に供する形態としては、上記膜小胞のような球状の膜に内包させて供する形態に限定されず、例えば、電極上に形成された平面膜のような平面状の膜を使用してもよい。

【0041】

好ましくは、上記 H^+ 濃度の変化の測定は、 H^+ 濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法または電氣的に測定する方法のいずれかによって行われる。

【0042】

さらに好ましくは、上記光学的変化に変換して測定する方法は、pH試験紙、pH感受性色素、または膜電位感受性色素を使用する。

【0043】

さらに好ましくは、上記電氣的に測定する方法は、金属電極法、ガラス電極法、ISFET電極法、パッチクランプ法、およびLAPS法からなる群から選択される方法である。

【0044】

より好ましくは、上記光学的変化に変換して測定する方法では、上記膜小胞内側のH⁺濃度の変化を、pH感受性色素を用いて測定する。

【0045】

上記塩基種判別用プライマーにおいて、置換対応領域に含まれる塩基数と非相補領域に含まれる塩基数との合計は、3塩基以上であることが好ましい。

【0046】

好ましい実施形態では、上記塩基種判別用プライマーの置換対応領域は、上記一本鎖核酸の3'末端塩基のみからなる。

【0047】

本発明の塩基種判別方法のさらに別の好ましい実施形態では、上記工程(a)において、上記溶液中に、第二の塩基種判別用プライマーをさらに含み、上記第二の塩基種判別用プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が上記第一の塩基種判別用プライマーがハイブリダイズする場合と同じ側の鎖の上記置換領域に対応するように、上記標的核酸の上記鎖にハイブリダイズすることが可能な第二の一本鎖核酸からなり、当該第二の一本鎖核酸は、上記標的核酸の上記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である塩基であって、かつ上記第一の上記一本鎖核酸の上記置換対応領域の上記塩基とは異なる塩基からなる3'末端に位置する第二の置換対応領域と、上記第二の置換対応領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸の上記鎖に対して非相補的な少なくとも2つの塩基からなる第二の非相補領域と、上記第二の非相補領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸の上記鎖に対して相補的な第二の相補領域であって、少なくとも上記標的核酸の上記置換領域の塩基と上記第二の置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合に、当該第二の一本鎖核酸が上記プライマー伸長反応の可能な条件下で上記標的核酸の上記鎖にハイブリダイズするのに十分な数の塩基からなる第二の相補領域とからなることを特徴とする。上記第二の置換対応領域は、一塩基からなることが最も好ましく、上記第二の非相補領域は、二塩基からなることが最も好ましく、そして上記第二の相補領域は、5以上の塩基からなることが好ましい。

【0048】

好ましくは、上記実施形態において、第一の一本鎖核酸と、第二の一本鎖核酸とは、長さが互いに異なる。

【0049】

好ましくは、上記実施形態において、第一の一本鎖核酸と、第二の一本鎖核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされている。

【0050】

本発明は、別の局面において、標的核酸の一塩基の置換領域の塩基種を判別するためのプライマーを提供する。本発明の塩基種判別用プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が上記標的核酸の上記置換領域に対応するように、当該標的核酸にハイブリダイズすることが可能な一本鎖核酸からなり、当該一本鎖核酸は、上記標的核酸の上記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかに相補的である塩基からなる3'末端に位置する置換対応領域と、上記置換対応領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して非相補的な少なくとも2つの塩基からなる非相補領域と、上記非相補領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して相補的な相補領域であって、少なくとも上記置換領域の塩基と上記置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合に、プライマー伸長反応の可能な条件下で上記プライマーが上記標的核酸にハイブリダイズするのに十分な数の

塩基からなる相補領域とを含むことを特徴とする。上記置換対応領域は、一塩基からなることが最も好ましく、上記非相補領域は、2塩基からなることが最も好ましく、そして上記相補領域は、5以上の塩基からなることが好ましい。

【0051】

本発明の塩基種判別用プライマーにおいて、置換対応領域に含まれる塩基数と上記非相補領域に含まれる塩基数との合計は、3塩基以上であることが好ましい。

【0052】

本発明の塩基種判別用プライマーの好ましい実施形態では、上記置換対応領域は、上記一本鎖核酸の3'末端塩基のみからなる。

【0053】

本発明は、さらに別の局面において、標的核酸における一塩基の置換領域の塩基種を判別するための塩基種判別用試薬キットを提供する。本発明の塩基種判別用試薬キットは、塩基種判別用プライマーと、DNAポリメラーゼと、dNTPsとを含む。本発明の塩基種判別用試薬キットにおいて、上記プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が上記標的核酸の上記置換領域に対応するように、当該標的核酸にハイブリダイズすることが可能な一本鎖核酸からなり、当該一本鎖核酸は、上記標的核酸の上記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかに相補的である塩基からなる3'末端に位置する置換対応領域と、上記置換対応領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して非相補的な少なくとも2つの塩基からなる非相補領域と、上記非相補領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して相補的な相補領域であって、少なくとも上記置換領域の塩基と上記置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合に、プライマー伸長反応の可能な条件下で上記一本鎖核酸が上記標的核酸にハイブリダイズするのに十分な数の塩基からなる相補領域からなる。上記置換対応領域は、一塩基からなることが最も好ましく、上記非相補領域は、二塩基からなることが最も好ましく、そして上記相補領域は、5以上の塩基からなることが好ましい。

【0054】

好ましくは、上記キットにおいて、DNAポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアゼ活性が実質的に無いことを特徴とする。

【0055】

好ましくは、上記キットにおいて、一本鎖核酸はDNAである。

【0056】

好ましくは、上記塩基種判別用試薬キットは、リバースプライマーをさらに含む。

【0057】

好ましくは、上記塩基種判別用試薬キットは、ピロホスファターゼをさらに含む。

【0058】

好ましくは、上記塩基種判別用試薬キットは、グリセルアルデヒド3-リン酸、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、および電子メディエータをさらに含む。より好ましくは、本発明の塩基種判別用試薬キットは、ジアホラーゼをさらに含む。

【0059】

さらに好ましくは、上記電子メディエータは、フェリシアン化物、1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノ-1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーからなる群より選択される少なくとも一種である。

【0060】

好ましくは、本発明の塩基種判別用試薬キットは、H⁺-ピロホスファターゼをさらに含む。より好ましくは、本発明の塩基種判別用試薬キットは、pH試験紙、pH感受性色素、または膜電位感受性色素のいずれかをさらに含む。

【0061】

本発明の塩基種判別用試薬キットは、さらに別の好ましい実施形態において、第二の塩基種判別用プライマーをさらに含み、上記第二の塩基種判別用プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が上記第一の塩基種判別用プライマーがハイブリダイズする場合と同じ側の鎖の上記置換領域に対応するように、上記標的核酸にハイブリダイズすることが可能な第二の一本鎖核酸からなり、上記第二の一本鎖核酸は、上記標的核酸の上記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかに相補的である塩基であって、かつ上記第一の上記一本鎖核酸の上記置換対応領域の上記塩基とは異なる塩基からなる3'末端に位置する第二の置換対応領域と、上記第二の置換対応領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して非相補的な少なくとも2つの塩基からなる第二の非相補領域と、上記第二の非相補領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して相補的な第二の相補領域であって、少なくとも上記標的核酸の上記置換領域の塩基と上記第二の置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合に、当該第二の一本鎖核酸が上記プライマー伸長反応の可能な条件下で上記標的核酸にハイブリダイズするのに十分な数の塩基からなる第二の相補領域とからなることを特徴とする。上記第二の置換対応領域は、一塩基からなることが最も好ましく、上記第二の非相補領域は、二塩基からなることが最も好ましく、そして上記第二の相補領域は、5以上の塩基からなることが好ましい。

【0062】

好ましくは、上記第一の一本鎖核酸と、上記第二の一本鎖核酸とは、長さが互いに異なる。

【0063】

好ましくは、上記第一の一本鎖核酸と、上記第二の一本鎖核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされている。

【0064】

好ましくは、本発明の塩基種判別用試薬キットは、当該試薬を用いて塩基種の判別を行うための手順その他の注意事項を示した指示書をさらに含んでもよい。さらに好ましくは、本発明の塩基種判別用試薬キットは、標的の塩基配列の増幅反応に使用するため、または増幅された塩基配列の定量的解析のために必要な他の試薬をさらに含んでもよい。

【0065】

(用語の定義)

本明細書中で、「標的核酸」とは、解析の対象となる塩基（単数または複数）を有する一本鎖または二本鎖の核酸をいい、通常、ゲノムDNAまたはその任意の断片であるが、RNAであってもよい。標的核酸の例としては、Alu配列、蛋白質をコードする遺伝子のエキソンやイントロン、プロモーターなどが挙げられる。あるいは、遺伝病を含む各種疾患、薬物代謝、生活習慣病（高血圧、糖尿病等）に関連する遺伝子またはその断片が挙げられる。さらに、このような遺伝子の部分あるいは遺伝子に関わる領域以外のゲノムDNA中のその他の部分も本発明の標的核酸の例として含まれ得る。標的核酸は、生物学的液体（例えば、血液、血清、血漿、唾液、リンパ液、精液、膿粘膜、便、尿、髄液など）または生物学的組織（例えば、毛髪、皮膚など）などから抽出され得る。あるいは、細胞培養物、植物、食物、法医学サンプル（例えば、紙、繊維、スクラップ、水、下水、薬物など）などから抽出することもできる。そのような抽出方法は、当業者に周知である。

【0066】

本発明についていう場合、「一本鎖の標的核酸」は、「二本鎖の標的核酸のいずれか一方の鎖」を含むものとする。

【0067】

本明細書中で、標的核酸について「置換領域」という場合、主として標的核酸中の一塩基多型部位を意味するが、これに限定されず、広く突然変異等により一塩基または二塩基以上が置換されているか、または置換されている可能性がある標的核酸中の一塩基または二塩基以上の領域も含むものとする。

【0068】

本明細書中で、「一塩基多型」または「SNP」は、当該分野で通常使用される意味で用いられる。

【0069】

本明細書中で、「アレル」または「対立遺伝子」は、当該分野で通常使用される意味で用いられる。

【0070】

本明細書中で、「置換対応領域」とは、本発明の塩基種判別用プライマーにおいて、当該プライマーが標的核酸にハイブリダイズする場合に、標的核酸の置換領域の塩基に対向する当該プライマーの塩基が存在する領域のことをいう。本発明において、塩基種判別用プライマーの置換対応領域は、典型的には、当該プライマーの3'末端にあり、標的核酸の置換領域の予想され得る塩基種のいずれかに相補的な一塩基からなる。

【0071】

本明細書中で、「非相補領域」は、本発明の塩基種判別用プライマーにおいて、置換対応領域の5'側に隣接し、そして当該プライマーが標的核酸にハイブリダイズする場合には、標的核酸の置換領域の3'側に隣接する領域に存在する塩基に対向する当該プライマーの塩基が存在する領域のことをいう。本発明において、塩基種判別用プライマーの非相補領域は、標的核酸の対応する塩基に対して非相補的な少なくとも2つ、最も好ましくは、2つのみの塩基からなる。

【0072】

本明細書中で、「相補領域」は、本発明の塩基種判別用プライマーにおいて、非相補領域の5'側に隣接し、そして当該プライマーが標的核酸にハイブリダイズする場合には、標的核酸の対応する塩基とハイブリダイズする、当該塩基に対して相補的な領域のことをいう。本発明において、塩基種判別用プライマーの相補領域は、少なくとも標的核酸の置換領域の塩基と塩基種判別用プライマーの置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合には、当該プライマーが、プライマー伸長反応が進行する条件下で、標的核酸にハイブリダイズし得るに十分な長さを有する。典型的には、相補領域の長さは、5塩基以上である。

【0073】

(発明の効果)

上記の特徴を有する本発明によれば、標的核酸における予め知られている塩基置換部位の塩基種を、正確にかつ再現性良く判別可能となる。特に、本発明は、標的核酸における一塩基多型部位の塩基種の判別、および突然変異等による一塩基の置換された部位の塩基種の判別に有用である。

【0074】

本発明の塩基種判別用プライマーは、3'末端側に少なくとも2塩基からなる非相補領域を有するため、プライマーの置換対応領域が標的核酸の置換領域の塩基と非相補的な塩基からなる場合、プライマーの3'末端において合計少なくとも3塩基が、標的核酸とハイブリダイズし得ず離間した状態となる。この場合、後述するように、ほぼ確実にプライマー伸長反応が進行しないため、プライマーの置換対応領域が標的核酸の置換領域の塩基と相補的である場合（この場合、プライマー伸長反応が進行する）との差違が、一層明確になる。このように、本発明のプライマーを使用することにより、プライマー伸長反応が進まないはずの場合にしっかりと反応が抑えられ、核酸が増幅する場合と増幅しない場合との区別が非常に明確になる。そのため、本発明は、標的核酸における塩基種の置換されている領域または置換されていると予想される領域の塩基種を、より正確に、かつ再現性よく判別することができるという顕著な効果を有する。

【0075】

本発明以前には、2塩基またはそれ以上からなる非相補領域（置換対応領域が標的核酸の置換領域に非相補的である場合を含まない。以下同様。）を有するプライマーを用いて塩基種判別用に用いるという例は、本発明者らの知る限りでは存在しない。これは、これまで、プライマーが標的核酸に対して2塩基以上の非相補領域を有する場合は、プライマー伸長が進行しにくいという考えが当該分野で一般的であったからであると考えられる。

その意味で、本発明は新規であり、かつ予測し得ない効果を有する。

【0076】

さらに、以下に詳述するように、本発明の塩基種判別用プライマーによれば、本発明のプライマーを用いて塩基配列増幅法により増幅された塩基配列の定量的解析を行うことによって、単数のみの本発明のプライマーを用いて、SNP部位の塩基が父親由来のものと母親由来のもので同じである（ホモ）か、あるいは異なる（ヘテロ）かを判別することも可能であり得る。このような、1つのみの塩基種判別用プライマーを用いる塩基種の判別は、本発明者らの知る限り、これまでに開示されていない。このような増幅された塩基配列の増幅量の定量的な解析は、より正確な塩基種の判別を可能とする本発明のプライマーを使用することにより、その効果が一層顕著なものとなり得る。

【0077】

このように、本発明によれば、核酸中の所望の塩基の種類を、正確に且つ再現性よく判別することができる。さらに、本発明により、プライマー伸長反応における温度、時間等の反応条件を厳密に制御する、あるいは用いるDNAポリメラーゼの種類を変更する等の作業が極力不要となる。

【0078】

本発明のこれらおよび他の目的、特徴、局面、効果は、添付図面と照合して、以下の詳細な説明から一層明らかなになるであろう。

図面の簡単な説明

【0079】

図1は、従来のSNPタイピング技術を説明する工程図であり、

図2は、従来のSNPタイピング技術を説明する工程図であり、

図3は、従来のSNPタイピング技術において得られたDNA断片を電気泳動によって解析した図であり、

図4(a)および図4(b)は、従来のタイピングプライマーの構造を表す図であり、

図5(a)～図5(d)は、プライマー伸長反応が確実に進行しない条件を調査する方法を説明する工程図であり、

図6は、プライマー伸長反応が確実に進行しない条件の調査において得られたDNA断片を電気泳動によって解析した図であり、

図7(a)～図7(c)は、実施形態1の塩基種判別方法において用いられるタイピングプライマーを模式的に示す図であり、

図8(a)～図8(d)は、実施形態1の一本鎖の標的核酸が有する置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法の各工程を表す図であり、

図9(a)～図9(d)は、実施形態1の一本鎖の標的核酸が有する置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法の各工程を表す図であり、

図10(a)～図10(c)は、実施形態2のSNPタイピングに用いるタイピングプライマーの構成を表す模式図であり、

図11は、PCR反応の条件を示す図であり、

図12は、PCR反応後の各PCR反応液中に含まれているピロリン酸量と、発光強度との関係を表す図であり、

図13は、プライマー伸長反応の条件を示す図であり、

図14は、プライマー伸長反応後の各プライマー伸長反応液中に含まれているピロリン酸量と発光強度との関係を表す図であり、

図15は、H⁺-ピロホスファターゼを模式的に表す図であり、

図16は、膜小胞に内包したH⁺-ピロホスファターゼを含む溶液の様子を模式的に示す図であり、

図17は、平面膜に内包したH⁺-ピロホスファターゼを用いたピロリン酸の測定装置を表す図であり、

図18は、PCR反応後における各PCR反応液それぞれの540nmの蛍光強度の変

化を表すグラフであり、

図 19 は、電流値を測定するための例示の測定装置系を示す模式図であり、

図 20 は、PCR 反応後の各 PCR 反応液中に含まれているピロリン酸量と、電流値との関係を表す図である。

好ましい実施形態の説明

【0080】

(実施形態 1)

国際公開第 01/042498 号パンフレットに開示される ASP を用いても、SNP タイピングを正確に且つ再現性よく行なうためには十分ではない場合がある。たとえ ASP を用いても、本来プライマー伸長反応が進行しないはずの場合に、プライマー伸長反応が起きてしまう可能性が残されている。これを解決するために、温度、時間等の反応条件をより厳密に制御する、あるいは用いる DNA ポリメラーゼの種類を変更する等の作業が必要となる。さらに、そのような作業を繰り返してもなお、SNP タイピングが困難な場合もある。

【0081】

そこで、本発明者らは、プライマー伸長反応が確実に進行しない条件を調査した。具体的には PCR 法を用いて、フォワードプライマーの 3' 末端の、一本鎖 DNA にハイブリダイズできない状態となっている塩基の数と、プライマー伸長反応の進行の程度との相関関係を調査した。

【0082】

調査方法を図 5 を参照しながら説明する。

【0083】

まず、図 5 (a) に示す工程で、標的の DNA 11 を含む試料溶液を調製する。続いて、DNA 11 を含む試料溶液に、フォワードプライマー 17a、リバープライマー 17b、DNA ポリメラーゼ 18 および 4 種類の dNTPs を添加する。

【0084】

次に、図 5 (b) に示す工程で、DNA 11 を熱変性などによって一本鎖 DNA 13 および 14 とする。

【0085】

次に、図 5 (c) に示す工程で、フォワードプライマー 17a およびリバープライマー 17b が、一本鎖 DNA 14 および一本鎖 13 にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。

【0086】

次に、図 5 (d) に示す工程で、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。

【0087】

上述の図 5 (b) ~ (d) に示す工程を繰り返し、フォワードプライマー 17a とリバープライマー 17b とに対応する DNA 断片を増幅する。

【0088】

なお、本調査において、DNA 11 として λ DNA を、DNA ポリメラーゼ 18 として、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有していない TaKaRa Taq (宝酒造 (株)) を用いた。また、本調査において用いたフォワードプライマー 17a およびリバープライマー 17b を表 1 および配列表に示す。リバープライマー 17b (配列番号 9) は、表 1 に示すように配列番号 1 ~ 8 に対して共通に用いられており、完全に λ DNA にハイブリダイズする塩基配列を有している。

【0089】

また、プライマー伸長反応の進行の程度を表す電気泳動の結果を図 6 に示す。表 1 に示す配列番号 1 ~ 8 と、配列表の配列番号 1 ~ 8 と、図 6 に示すレーン番号 1 ~ 8 とはそれぞれ対応している。

【0090】

【表1】

| 番号 | フォワードプライマー | リバースプライマー |
|----|---------------------|----------------|
| 1 | λ300-1 (配列番号1) | λ300-2 (配列番号9) |
| 2 | λ300-1mA (配列番号2) | λ300-2 |
| 3 | λ300-1mT (配列番号3) | λ300-2 |
| 4 | λ300-1m2CT (配列番号4) | λ300-2 |
| 5 | λ300-1m2CA (配列番号5) | λ300-2 |
| 6 | λ300-1m3ACT (配列番号6) | λ300-2 |
| 7 | λ300-1m3ACA (配列番号7) | λ300-2 |
| 8 | λ300-1m3ACC (配列番号8) | λ300-2 |

【0091】

λDNAに完全にハイブリダイズする塩基配列を有する番号1のフォワードプライマーを用いた場合、図6のレーン1に示すように矢印Bで示される位置にフォワードプライマーおよびリバースプライマーに応じたDNA断片が増幅された。

【0092】

3'末端に位置する塩基のみλDNAにハイブリダイズしない番号2および3のフォワードプライマーを用いた場合にも、図6のレーン2および3に示すように、レーン1と全く同じDNA断片が増幅された。

【0093】

番号4および5のフォワードプライマーは共に、3'末端から数えて1つ目の塩基および2つ目の塩基（合計2つの塩基）がλDNAにハイブリダイズしない塩基配列を有する。番号5のフォワードプライマーを用いた場合、図6のレーン5に示すように、レーン1と同じDNA断片は増幅されなかった。しかし、番号4のフォワードプライマーを用いた場合、レーン1と同じDNA断片が増幅された。これは、たとえタイピングプライマーの3'末端の塩基と3'末端から2つ目の塩基という合計2つの塩基が標的配列とハイブリダイズしない場合でも、プライマー伸長反応が進行してしまうことがあることを示している。また、これは特開2002-101899号公報に開示されるタイピングプライマーにおいて、3'末端の塩基が標的核酸のSNP部位の塩基と相補的でない場合に相当しており、特開2002-101899号公報においては、プライマー伸長反応が進行しないはずの場合に相当する。したがって、特開2002-101899号公報に開示されるタイピングプライマーを用いても、未だにSNPタイピングを正確かつ再現性よく行うためには十分でないことがわかる。

【0094】

番号6～8のフォワードプライマーはいずれも、3'末端に位置する3塩基がλDNAにハイブリダイズしない塩基配列を有する。番号6～8のフォワードプライマーを用いた場合、図6のレーン6～8に示すように、レーン1と同じDNA断片はほとんど増幅されなかった。

【0095】

以上の結果から、3'末端に位置する3塩基が標的核酸にハイブリダイズしないフォワードプライマーでは、プライマー伸長反応がほぼ確実に進行しないことが確認された。

【0096】

本発明者らは、以上の結果から、タイピングプライマーを用いてSNPタイピングを行なう際に、プライマー伸長反応がほぼ確実に進行しない条件は、タイピングプライマーの3'末端から数えて3つ以上の塩基が、標的核酸にハイブリダイズしないことであると考えた。

【0097】

以下、上記考察に基づいて、本発明の実施形態を、図を参照しながら説明する。

【0098】

図7(a)、(b)および(c)は、本実施形態の塩基種判別方法において用いられる

塩基種判別用プライマー（【0007】段のタイピングプライマーと厳密には違うものだが、役割は同じものなので、これもタイピングプライマーと称する）を模式的に示す図である。

【0099】

本実施形態のタイピングプライマー10は、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなる。ここで、標的核酸における置換領域の存在する位置は、既知であるものとする。タイピングプライマー10を構成する一本鎖の核酸は、図7（a）に示すように、置換対応領域Xと、非相補領域Yと、相補領域Zとを備えている。

【0100】

置換対応領域Xは、タイピングプライマー10を構成する一本鎖の核酸の3'末端塩基を含み、一本鎖の標的核酸の置換領域の予想され得る塩基種のいずれかに相補的な塩基を有する。

【0101】

非相補領域Yは、置換対応領域Xの5'側に隣接し、一本鎖の標的核酸に対して非相補的な塩基配列を有する。好ましくは、非相補領域Yは、少なくとも2つの塩基からなり、最も好ましくは、2つの塩基からなる。

【0102】

相補領域Zは、非相補領域Yの5'側に隣接し、一本鎖の標的核酸に対して相補的な塩基配列を有する。相補領域Zは、好ましくはタイピングプライマー10が、プライマー伸長反応の可能な条件下で一本鎖の標的核酸にハイブリダイズするのを可能にするに十分な長さを有する。

【0103】

上記のような構成を有する本発明のタイピングプライマーは、当業者に周知の通常技術により作製し得る。例えば、本発明のタイピングプライマーは、当業者が容易に入手可能な市販のDNAシンセサイザーを用いて、ホスホアミダイト法のような当該分野で周知のDNAの合成法により作製し得る。

【0104】

また、本明細書中で、「プライマー」とは、少なくとも8個のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む、一本鎖のヌクレオチド配列であり、通常、プライマー伸長反応の進行する条件下で、標的核酸にハイブリダイズし得る程度に十分な長さと、標的配列に対する相補性とを有する。本発明において、プライマーの長さは、8～100塩基であることが好ましく、より好ましくは10～60塩基、さらにより好ましくは12～40塩基であり、さらにより好ましくは14～35塩基、さらにより好ましくは16～30塩基、そして最も好ましくは18～25塩基である。

【0105】

本実施形態のタイピングプライマー10を、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸34および35にそれぞれ作用させた場合、図7（b）および図7（c）に示す状態となる。なお、実際のゲノムDNA等では無数のSNP部位等のような塩基が置換された領域が存在するが、ここでは一本鎖の標的核酸34および35は、それらのうちのタイピングプライマー10が結合する領域において、置換領域34rおよび35rの塩基配列の塩基種が互いに異なり、置換領域34rおよび35rを除いて互いに全く同じ塩基配列を有するものとする。

【0106】

図7（b）および図7（c）に示すように、相補領域Zは、一本鎖の標的核酸34および35にハイブリダイズする。また、非相補領域Yは、図7（b）および図7（c）に示すように、一本鎖の標的核酸34および35にハイブリダイズすることができない。置換対応領域Xの塩基配列が、一本鎖の標的核酸34の置換領域34rの塩基配列に相補的な塩基配列である場合、図7（b）に示すように、置換対応領域Xは一本鎖の標的核酸34の置換領域34rにハイブリダイズする。一方、置換対応領域Xの塩基配列が、一本鎖の

標的核酸 3 5 の置換領域 3 5 r の塩基配列に非相補的な塩基配列である場合、図 7 (c) に示すように、一本鎖の標的核酸 3 5 の置換領域 3 5 r にハイブリダイズできない。

【0107】

図 7 (b) に示すように、タイピングプライマー 1 0 は、一本鎖の標的核酸 3 4 に対して非相補領域 Y が離間した状態となるものの、置換対応領域 X は一本鎖の標的核酸 3 4 の置換領域 3 4 r にハイブリダイズしている。このため、3' 末端から核酸を伸長させる酵素である DNA ポリメラーゼが、タイピングプライマー 1 0 の 3' 末端に正常に作用できる状態となる。

【0108】

これに対して、図 7 (c) に示すように、タイピングプライマー 1 0 が作用する一本鎖の標的核酸 3 5 に対して、タイピングプライマー 1 0 は、非相補領域 Y および置換対応領域 X がいずれもハイブリダイズできず、一本鎖の標的核酸 3 5 に対して非相補領域 Y および置換対応領域 X が離間した状態となる。このため、DNA ポリメラーゼが、タイピングプライマー 1 0 の 3' 末端に正常に作用できない。

【0109】

このため、図 7 (b) に示すように、置換対応領域 X の塩基配列が、一本鎖の標的核酸 3 4 の置換領域 3 4 r の塩基配列と相補的な塩基配列であり、一本鎖の標的核酸 3 4 の置換領域 3 4 r にハイブリダイズする場合、プライマー伸長反応は良好に生じる。しかし、図 7 (c) に示すように、置換対応領域 X が、一本鎖の標的核酸 3 5 の置換領域 3 5 r の塩基配列と非相補的な塩基を有しており、一本鎖の標的核酸 3 5 の置換領域 3 5 r にハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は良好に生じない。

【0110】

従って、図 7 (b) に示す、一本鎖の標的核酸 3 4 の置換領域 3 4 r とタイピングプライマー 1 0 の置換対応領域 X とが相補的である場合と、図 7 (c) に示す、一本鎖の標的核酸 3 5 の置換領域 3 5 r とタイピングプライマー 1 0 の置換対応領域 X とが非相補的である場合との間での、プライマー伸長反応の進行の差が大きくなる。

【0111】

そこで、両者の間で、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸 3 4 および 3 5 のそれぞれの置換領域 3 4 r および 3 5 r の塩基配列の塩基種を判別することができる。

【0112】

次に、上記タイピングプライマー 1 0 を用いて、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む二本鎖の標的核酸において、置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法を、図 8 (a) ~ 図 8 (d) および図 9 (a) ~ 図 9 (d) を参照しながら説明する。ここでもまた、標的核酸における塩基種が置換されている可能性のある置換領域の位置は予めわかっている。図 8 (a) ~ 図 8 (d) および図 9 (a) ~ 図 9 (d) は、本実施形態の二本鎖の標的核酸が有する置換領域の塩基配列の塩基種を、PCR 法を利用して判別する方法の各工程を表す図である。

【0113】

まず、図 8 (a) に示す工程で、置換領域 3 4 r および 4 4 r を有する標的の核酸 3 6 を含む試料溶液を調製する。続いて、核酸 3 6 を含む試料溶液に、タイピングプライマー 1 0、リバースプライマー 2 0、DNA ポリメラーゼ 3 0 および 4 種類の dNTPs を添加する。同様に、図 9 (a) に示す工程で、置換領域 3 5 r および 4 5 r を有する標的の核酸 3 8 を含む試料溶液を調製する。続いて、核酸 3 8 を含む試料溶液に、タイピングプライマー 1 0、リバースプライマー 2 0、DNA ポリメラーゼ 3 0 および 4 種類の dNTPs を添加する。なお、実際のゲノム DNA 等では無数の SNP 部位のような塩基が置換された領域が存在するが、ここでは標的の核酸 3 6 および 3 8 は、それらのうちのタイピングプライマー 1 0 およびリバースプライマー 2 0 が結合する領域においては、置換領域 3 4 r および 4 4 r と、置換領域 3 5 r および 4 5 r とを除いて互いに全く同じ塩基配列を有するものとする。

【0114】

次に、図8（b）に示す工程で、核酸36を熱変性などによって一本鎖の標的核酸34および44とする。同様に、図9（b）に示す工程で、核酸38を熱変性などによって一本鎖の標的核酸35および45とする。

【0115】

次に、図8（c）に示す工程で、タイピングプライマー10およびリバースプライマー20が、一本鎖の標的核酸34および一本鎖の標的核酸44にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー10の相補領域Zが、一本鎖の標的核酸34にハイブリダイズする。また、タイピングプライマー10の置換対応領域Xが、一本鎖の標的核酸34の置換領域34rにハイブリダイズする。一方、図9（c）に示す工程でも同様に、タイピングプライマー10およびリバースプライマー20が、一本鎖の標的核酸35および一本鎖の標的核酸45にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー10の相補領域Zのみが、一本鎖の標的核酸35にハイブリダイズする。

【0116】

次に、図8（d）に示す工程で、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー10の置換対応領域Xが一本鎖の標的核酸34の置換領域34rにハイブリダイズしているので、プライマー伸長反応が進行し、DNAポリメラーゼ30によってdNTPsが消費される。

【0117】

一方、図9（d）に示す工程でも同様に、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。しかしながら、置換対応領域Xが、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rにハイブリダイズできないので、プライマー伸長反応が正常に進行しにくい。

【0118】

本実施形態では、PCR法の手順に基づいて、図8（b）～（d）に示す工程、ならびに図9（b）～（d）に示す工程をそれぞれ繰り返す。

【0119】

以上の工程を実施した後、プライマー伸長反応の進行の差（特に本実施形態では、増幅された核酸の量の差）を解析することによって、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基配列の塩基種を判別することができる。

【0120】

特に、上述のプライマー伸長反応がほぼ確実に進行しない条件の考察から、図9（c）に示す工程において、タイピングプライマー10のハイブリダイズしない塩基の数（すなわち、置換対応領域Xに含まれる塩基数と非相補領域Yに含まれる塩基数との合計）が3塩基以上とすることが好ましい。このことによって、置換対応領域Xが、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rにハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は、ほぼ確実に生じなくなる。従って、プライマー伸長反応の進行の差が非常に明確になる。

【0121】

プライマー伸長反応の進行の差が大きくなると、プライマー伸長反応の進行の差を解析した結果にも、非常に明確な差が現れる。従って、標的核酸が置換領域34rおよび35rのいずれの塩基配列を有するのかをより正確に判別することが可能である。

【0122】

本実施形態では、タイピングプライマー10からのプライマー伸長反応を、PCR法を利用して行なったが、これに限定されず、SDA、RCR、LAMPおよびTMA反応等の特定の塩基配列の核酸を増幅する方法を利用することができる。プライマー伸長反応の進行の差を解析する方法は、上記の方法により増幅された核酸を電気泳動等の方法で解析する方法、上記の方法の過程で生成されるピロリン酸等の量を解析する方法が挙げられる。

【0123】

なお、ここではリバースプライマー20を添加する方法を説明したが、これに限られな

い。例えば、リバースプライマー20を添加せずに、タイピングプライマー10からのプライマー伸長反応のみを行ない、プライマー伸長反応の過程で生成されるピロリン酸等の量を解析してもよい。

【0124】

また、上述の方法に特に限られることはなく、正確にプライマー伸長反応の進行の差を解析できる方法であれば用いることが可能である。

【0125】

なお、タイピングプライマー10を構成する核酸としては、DNAが好ましい。DNAは、化学的に非常に安定であり、取り扱いも簡単で、入手も容易だからである。勿論、必要に応じてチオールDNA、RNAなどを用いてタイピングプライマー10を作製してもよい。

【0126】

プライマー伸長反応においてdNTPsを用いる場合、核酸ポリメラーゼとして、DNAポリメラーゼを用いる必要がある。DNAポリメラーゼには、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するものと有さないものがあるが、本実施形態ではDNAポリメラーゼとして3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無い(3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さない、あるいは有していてもその活性が非常に弱いため測定上無視し得る。以下同様。)ものを用いることが好ましい。その理由としては、本実施形態におけるタイピングプライマー10を用いた場合、前述の通り、置換対応領域Xが一本鎖の標的核酸35の置換領域35rとが非相補的であるので、タイピングプライマー10の置換対応領域Xおよび非相補領域Yのヌクレオチドが一本鎖の標的核酸に対してハイブリダイズできずに浮いたような状態となる。このような場合、通常、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いDNAポリメラーゼは正常なプライマー伸長反応を起こせない。しかし、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の強いDNAポリメラーゼを用いると、その活性により、置換対応領域Xおよび非相補領域Yのヌクレオチドを切断した後に、プライマー伸長反応を進行させてしまうことがある。従って、一本鎖の標的核酸の置換領域の正確な塩基種の判別が不可能となるおそれがあるからである。

【0127】

そこで具体的には、TaKaRa Taq(宝酒造(株)製)、やrTaq DNA POLYMERASE(東洋紡(株)製)、Taq DNA POLYMERASE(Amersham Pharmacia Biotech製)、Tfl DNA POLYMERASE(promega製)、Hot Tub DNA POLYMERASE(Amersham Pharmacia Biotech製)、Tth DNA POLYMERASE(東洋紡(株)製)、rTth DNA POLYMERASE(TOYOBO, PE Biosystems製)、Ampli Taq DNA POLYMERASE(アプライドバイオシステムズ製等のDNAポリメラーゼ)のような3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有さないDNAポリメラーゼを用いることが好ましい。このことによって、上述のようなおそれが無くなり、一本鎖の標的核酸の置換領域のより正確な塩基種の判別を行なうことができる。これらの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有さないDNAポリメラーゼを使用するさらなる利点としては、これらが安価であるということが挙げられる。さらに、ここに挙げたように、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有さないDNAポリメラーゼは、種類も豊富で入手も容易である。

【0128】

本発明により、プライマー伸長反応における温度、時間等の反応条件を厳密に制御する、あるいは用いるDNAポリメラーゼの種類を変更する等の作業が極力不要となる。例えば、本発明のタイピングプライマーによれば、PCRサイクルにおいてアニーリング温度を、約50℃～約60℃の範囲のいずれに設定しても、プライマー伸長反応が進行する場合としない場合とで、進行の差が非常に明確に表れることが本発明らにより確認されている。

【0129】

(実施形態2)

本実施形態では、上記実施形態1で説明したタイピングプライマー10のうち、特にSNPタイピングに適したタイピングプライマーを説明する。

【0130】

SNPは、ゲノムDNAの塩基配列中のある特定部位に観察される一塩基対の相違（置換）である。置換対応領域Xが3'末端塩基のみであるタイピングプライマー10を用いることによって、正確なSNPタイピングが可能である。

【0131】

ここで具体的に、SNPタイピングに用いるタイピングプライマーを、図10(a)～図10(c)を参照しながら説明する。図10(a)～図10(c)は、SNPタイピングに用いるタイピングプライマーの構成を表す図である。

【0132】

SNPタイピングに用いるタイピングプライマー10'は、一本鎖の核酸からなる。核酸としては、DNAが好ましい。DNAは、化学的に安定であり、取り扱いも簡単で、入手も容易だからである。勿論、必要に応じて、チオールDNA、RNAなどを用いてタイピングプライマー10'を作製してもよい。タイピングプライマー10'では、その3'末端に位置する塩基（図中N1）が、一本鎖の標的核酸54および56のSNP部位の塩基S1およびS2に対応する。ここで、標的核酸54および56のSNP部位は予め分かっているものとする。また、タイピングプライマー10'の3'末端から数えて2番目（図中N2）および3番目（図中N3）の塩基は、それぞれ一本鎖の標的核酸54および56のSNP部位から3'方向に数えて2番目および3番目の塩基に対して必ず非相補的であり、さらに、タイピングプライマー10'の3'末端から数えて4番目から5'末端までの塩基配列は、一本鎖の標的核酸54および56のSNP部位から3'方向に数えて4番目から3'側への塩基配列に対して相補的であるように設計されている。

【0133】

ここで、塩基N1と塩基S1とが相補的であり、塩基N1と塩基S2とは非相補的であると仮定する。また、プライマー伸長反応においてdNTPsを用いる場合、核酸ポリメラーゼとしてDNAポリメラーゼを用いる。

【0134】

図10(b)に示すように、SNP部位の塩基がS1である一本鎖の標的核酸54に対して、タイピングプライマー10'の3'末端から数えて2番目および3番目の塩基N2およびN3はハイブリダイズできないが、3'末端塩基N1は、一本鎖の標的核酸54のSNP部位の塩基S1にハイブリダイズする。このため、DNAポリメラーゼ28が、タイピングプライマー10'の3'末端に正常に作用できる。従って、プライマー伸長反応が良好に進行する。

【0135】

一方、図10(c)に示すように、SNP部位の塩基がS2である一本鎖の標的核酸56に対して、タイピングプライマー10'の3'末端塩基N1、3'末端から数えて2番目および3番目の塩基N2およびN3の全て、ハイブリダイズできない。このため、DNAポリメラーゼ28が、タイピングプライマー10'の3'末端に正常に作用できず、プライマー伸長反応が正常に進行しにくい（表1および図6もまた参照のこと）。

【0136】

すなわち、図10(b)に示すように、タイピングプライマー10'の3'末端塩基と、一本鎖の標的核酸54のSNP部位の塩基とが相補的な関係であればプライマー伸長反応は良好に起こるが、図10(c)に示すように、タイピングプライマー10'の3'末端塩基と、一本鎖の標的核酸56のSNP部位の塩基とが非相補的であればプライマー伸長反応はほとんど進行しない。

【0137】

タイピングプライマー10に代えて、上記のように設計されたタイピングプライマー1

0'を用いて、上記実施形態1で述べた置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法について記載したものと同様の手順でプライマー伸長反応を行なった後、プライマー伸長反応の進行の差を解析すれば、正確なSNPタイピングが可能となる。従って、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸のSNP部位の塩基配列の塩基種を判別することができる。

【0138】

また、本実施形態におけるタイピングプライマーを用いればSNPタイピングのみならず、突然変異等による一塩基変異の解析やあるいはそれらに限られず所望の一塩基の種類を決定することも可能である。

【0139】

(実施形態3)

ヒトなどの高等生物のゲノムは、父親由来のものと母親由来のものから成っている。このような父親から受け継ぐ遺伝子と母親から受け継ぐ遺伝子からなる一对の遺伝子を対立遺伝子(アレル)という。このため、SNPタイピングにおいて、SNP部位の塩基が父親由来のものと母親由来のもので同じである(ホモ)か、あるいは異なる(ヘテロ)かを判別することも非常に重要となっている。このようなSNPタイピングにも、上記実施形態2のタイピングプライマーを用いることができる。

【0140】

例えば、ヒトから採取された試料において、一本鎖の標的核酸におけるSNP部位の塩基がチミン(以下、Tと記す)かシトシン(以下、Cと記す)であることが予め分かっている場合を説明する。

【0141】

このとき、上記のように倍数体のゲノムをもつヒトのような高等生物では、子供が両親から受け継いだ遺伝子の考えられるSNPパターンはT/Tのホモ、C/Cのホモ、そしてT/Cのヘテロの3通りである。これらを判別するために、SNP部位の塩基がTの場合のみにプライマー伸長反応が進行するタイピングプライマー(タイピングプライマーAとする)と、Cの場合のみにプライマー伸長反応が進行するタイピングプライマー(タイピングプライマーBとする)とを用いて、それぞれPCR反応を行なう。なお、このとき、タイピングプライマーAおよびBは、いずれも上記実施形態2に示したタイピングプライマー10'と全く同様に設計されており、リバースプライマーは上記実施形態2に示したものと同一のものが用いられる。

【0142】

次に、それぞれのDNA断片について電気泳動等による解析を行えば、SNPパターンのタイピングが可能となる。

【0143】

具体的には、タイピングプライマーAを用いたときにのみDNA断片の増幅が認められた場合のSNPパターンはT/T、タイピングプライマーBを用いたときにのみDNA断片の増幅が認められた場合のSNPパターンはC/C、両方のタイピングプライマーを用いてDNA断片の増幅が認められた場合のSNPパターンはT/Cと判別することができる。

【0144】

また、上記のタイピングプライマーAおよびタイピングプライマーBのそれぞれの相補領域Xの長さを互いに異なるように設計すれば、タイピングプライマーAとリバースプライマーとから増幅されるDNA断片と、タイピングプライマーBとリバースプライマーとから増幅されるDNA断片とは、互いに異なる長さとなる。このため、両者のDNA断片は、同時に電気泳動を行なっても重複することがない。従って、タイピングプライマーAとタイピングプライマーBとを同時に混合し、リバースプライマーを用いてPCR反応を行なった後、同時に電気泳動等により解析を行なうことによって、迅速にSNPパターンのタイピングが可能となる。

【0145】

あるいは、上記のタイピングプライマーAおよびタイピングプライマーBのそれぞれに互いに蛍光波長が異なる標識を行なえば、タイピングプライマーAとリバースプライマーとから増幅されるDNA断片と、タイピングプライマーBとリバースプライマーとから増幅されるDNA断片とは、異なる波長の蛍光を発する。このため、それぞれのDNA断片を個別に検出することができる。従って、タイピングプライマーAとタイピングプライマーBとを同時に混合し、リバースプライマーを用いてPCR反応を行なった後、電気泳動等によって増幅されたDNA断片を単離し、その蛍光波長を解析することによって、迅速にSNPパターンをタイピングすることができる。そのような互いに蛍光波長が異なる標識の例としては、Cy3（登録商標）（Amersham Life Science, Inc.）およびCy5（登録商標）（Amersham Life Science, Inc.）の組み合わせ、あるいはJOE（550nmに発光ピークを有する）、ROX（600nmに発光ピークを有する）、FAM（520nmに発光ピークを有する）、およびTAMRA（580nmに発光ピークを有する）の中から選択されるいずれかの標識の任意の組み合わせなどが挙げられる。これらの標識試薬は、例えば、Invitrogen（登録商標）やフナコシ株式会社などの当業者に周知の供給業者から市販品として容易に入手可能である。

【0146】

さらに、上記のタイピングプライマーAのみを用いて、同様にSNPパターンのタイピングを行なうことも可能である。

【0147】

具体的には、タイピングプライマーAとリバースプライマーとを用いてPCR反応を行ない、その後電気泳動等で解析する。SNPパターンがT/Tの場合とT/Cの場合はDNA断片の増幅が確認されるが、C/Cの場合はDNA断片の増幅がほとんど確認されない。そしてさらに、SNPパターンがT/Tの場合は、SNPパターンがT/Cの場合と比べて、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がTである一本鎖の標的核酸の量が2倍となるので、DNA断片が増幅の程度が明らかに大きくなる。従って、DNA断片の増幅量を解析することによって、SNP部位のSNPパターンをタイピングすることが可能となる。このような核酸増幅量の定量的な解析によるホモとヘテロの判別は、DNA断片が増幅する場合と増幅しない場合との差違が明確に表れる本発明のプライマーを使用することにより、有利に行うことができる。

【0148】

また、SNP部位の塩基種が3種類あるいは4種類の可能性がある場合でも、それに対応して、3'末端に位置する塩基N1が3種類あるいは4種類の上記実施形態2のタイピングプライマーを用いれば、SNPタイピングすることが可能である。

【0149】

（実施形態4）

さらに、上記実施形態1～3と同様にゲノムDNAおよびタイピングプライマーを用いて、PCR反応のような塩基配列増幅法により核酸を増幅した後、その増幅反応液を、H⁺-ピロホスファターゼを膜内に有する膜小胞を含む測定系に供し、その膜小胞の内外で生じるH⁺濃度の変化を測定することによって、核酸の増幅量を解析し、塩基種の判別を行うこともできる。

【0150】

H⁺-ピロホスファターゼは、通常、植物の液胞膜内に存在する膜タンパク質であり、1分子のピロリン酸から2分子のリン酸を生成する加水分解反応に伴って、液胞膜の外側から液胞膜の内側に向けH⁺を輸送する性質を有する。この性質を利用して、H⁺-ピロホスファターゼを内包する天然または人工の膜小胞を、増幅された核酸を含む試料に供し、膜内外でのH⁺濃度の変化を、例えば、pH試験紙、pH感受性色素（例えば、アクリジンオレンジなど）、膜電位感受性色素（例えば、DiBAC₄（3）（Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol）、DiBAC₄（5）（Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol;）、DiSBAC₂（3）（Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol）、di-4-ANNEPS、DiOC₆

(3) (dihexaocarbocyanine iodide)、オクソールVなど)等を用いる光学的方法により、あるいは、金属電極法(水素電極法、キンヒドロソニウム電極法、アンチモン電極法など)、ガラス電極法、ISFET電極法、パッチクランプ法、LAPSS法等の電気化学的方法により測定して、核酸の増幅反応により生じるピロリン酸を定量的に測定することができる。このようにして測定したピロリン酸の量に基づいて、ゲノムDNA中のSNP部位のタイピングを含む標的核酸中の置換領域の塩基種の判別を行うことができる。なお、H⁺-ピロホスファターゼは、膜小胞のような球状の膜に限らず、平面膜(例えば、電極上に形成された平面膜)内に内包させてもよい。

【0151】

例えば、図17に示すような、容器204、電極205、及び容器204内に設けられた内部槽206を備えるピロリン酸測定装置200において、H⁺-ピロホスファターゼが内在している平面状の膜207を使用してもよい。ピロリン酸測定装置200の内部槽206の底部には、H⁺感受性電極208が設けられ、H⁺-ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、内部槽206の外部に露出している。容器204内に試料溶液202が注入されると、試料溶液202中にピロリン酸が存在する場合、H⁺-ピロホスファターゼの酵素反応が生じて、膜207によって隔てられた内部槽206の内部領域209ではH⁺濃度が増大し、内部槽206の外部ではH⁺濃度が減少する。このため、電極205とH⁺感受性電極208とを用いて、電気的にH⁺濃度の変化を測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。本実施形態では、予め容器204及び内部領域209内に試料溶液202を注入するが、これに限定されない。例えば、膜207を予め内部槽206内のH⁺感受性電極208上に配置しておき、試料溶液202を容器204中に添加してもよい。このことによって、容器204内に試料溶液202を注入すると、試料溶液202のうちの膜207を透過する成分(つまりピロリン酸を含まない溶液)が内部領域209を満たし、電極205とH⁺感受性電極208とを用いて、電気的にH⁺濃度の変化を測定することが可能になる。

【0152】

なお、ピロリン酸を加水分解する活性部位が、内部領域209に露出しているH⁺-ピロホスファターゼが膜207に含まれていてもよい。但し、ピロリン酸を加水分解する活性部位が内部領域209に露出しているH⁺-ピロホスファターゼが含まれている膜207を用いる場合、内部領域209のピロリン酸の濃度は、内部槽206の外部のピロリン酸の濃度よりも低くしておくことが好ましく、内部領域209にはピロリン酸を含まないことが最も好ましい。このことによって、内部領域209から内部槽206の外部へのH⁺の輸送が減少あるいは停止し、内部槽206の外部から内部領域209へのH⁺の輸送が優勢となって、内部槽206の外部及び内部領域209のH⁺濃度の変化が、試料溶液202中に含まれるピロリン酸によるものにほぼ限定される。従って、試料溶液202中に含まれるピロリン酸の量を正確に見積もることができる。

【0153】

また、膜207には、H⁺-ピロホスファターゼ以外のタンパク質が含まれていてもよい。但し、これらのタンパク質は、ピロリン酸と反応しない、あるいは反応性の低いタンパク質であることが好ましい。すなわち、ピロリン酸が膜207中にあるH⁺-ピロホスファターゼ以外のタンパク質と反応する場合、H⁺-ピロホスファターゼと反応するピロリン酸の量が減少し、それに伴って、H⁺の輸送量が減少するからである。また、ピロリン酸とは反応せず、且つピロリン酸以外の物質との反応によってH⁺を輸送するタンパク質が膜207に含まれている場合、そのタンパク質が反応する物質が試料溶液202中にほとんど含まれていないことが好ましい。具体的には、膜207に、ピロリン酸とほとんど反応せず、且つATPとの反応によってH⁺を輸送するタンパク質であるATPaseが含まれている場合、試料溶液202中にATPをほとんど含まないようにすることが好ましい。

【0154】

また、ピロリン酸測定装置200では、電極205とH⁺感受性電極208とによって

、電氣的にピロリン酸の量を測定しているが、これに限定されない。例えば、pH感受性色素または膜電気感受性色素を含む溶液を内部槽206の内部領域209に添加してもよい。このことによって、内部のH⁺濃度の増大に伴ってpH感受性色素または膜電位感受性色素の蛍光強度が変化する。この蛍光強度の変化を光学的に測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。

【0155】

(実施形態5)

あるいは、上記実施形態1～3と同様にゲノムDNAおよびタイピングプライマーを用いて、PCR反応のような塩基配列増幅法により核酸を増幅した後、その増幅反応液中のピロリン酸の量を、ピロホスファターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼの3種類の酵素を用いて電気化学的手法により解析することによって、核酸の増幅量を解析し、塩基種の判別を行うこともできる。

【0156】

具体的には、電気化学測定用の容器内において、増幅反応からの試料溶液に、まず、ピロホスファターゼを作用させ、核酸の増幅反応により生じたピロリン酸を無機リン酸に加水分解する。その電気化学測定用の容器は、内部に電流測定用の複数の電極を有し、それらは、市販の電気化学測定システム(例えば、北斗電工製)に接続されている。

【0157】

次いで、その無機リン酸に、グリセルアルデヒド3-リン酸および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの存在下で、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを作用させ、1, 3-ビスホスホグリセリン酸および還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドに変換する。

【0158】

次いで、生じた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを、電子メディエータ(例えば、フェリシアン化物、1, 2-ナフトキノ-4-スルホン酸、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノ-1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、メルドラブルー等)の酸化体とともに、ジアホラーゼと反応させ、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび電子メディエータの還元体とする。

【0159】

最後に、生じた電子メディエータの還元体を、当該電気化学測定用の容器内の作用電極上で電気化学的に酸化し、それによって放出される電子を、上記電気化学測定システムによって電流値として測定することによって、当該電流値に基づいて核酸の増幅量を測定することができる。このような定量的な解析に基づいて、SNP部位のタイピングなど、標的核酸の置換領域の塩基種の判別を行うことができる。

【0160】

(実施形態6)

(キット)

本発明の塩基種判別用プライマーは、プライマー伸長反応等のために必要な他の試薬等とともに、塩基種判別用試薬キットとしても提供され得る。代表的には、本発明の塩基種判別用試薬キットは、本発明の塩基種判別用プライマーと、DNAポリメラーゼと、dNTPsとを含む。DNAポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いものが好ましい。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いると、塩基種判別用プライマーの置換対応領域が、標的核酸の置換領域の塩基と非相補的な塩基を有しており、標的核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合にも、当該ポリメラーゼにより置換対応領域および非相補領域のヌクレオチドが切断されてしまい、その後プライマー伸長反応が進行してしまうからである。したがって、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いものを使用すれば、そのようなことが生じることを防止し得、標的核酸の置換領域の正確な塩基種の判別が不可能となるおそれが解消される。

【0161】

また、上記キットにおいて、上記プライマーはDNAであることが好ましい。DNAは、化学的に非常に安定であり、取り扱いも簡単で、入手も容易だからである。

【0162】

本発明の塩基種判別用試薬キットは、PCR等による塩基配列増幅反応に用いるための他の試薬をさらに含んでもよい。そのような試薬には、例えば、リバースプライマーが含まれる。

【0163】

また、本発明の塩基種判別用試薬キットは、増幅された核酸断片の量を測定するための試薬をさらに含んでもよい。そのような試薬としては、一般的には、ピロホスファターゼが挙げられる。さらに、本発明の特定の実施形態では、グリセルアルデヒド3-リン酸、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、および電子メディエータを含んでもよい。好ましくは、さらにジアホラーゼを含む。電子メディエータの例としては、フェリシアン化物、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーなどが挙げられる。これらの試薬は、当業者にとって市販品として容易に入手可能である。

【0164】

本発明の塩基種判別用試薬キットのさらに別の特定の実施形態では、増幅されたDNA断片の量を測定するための他の試薬として、膜小胞に内包されたH⁺-ピロホスファターゼをさらに含んでもよい。さらに、pH試験紙、pH感受性色素（例えば、アクリジンオレンジなど）、または膜電位感受性色素（例えば、DiBAC₄(3) (Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol)、DiBAC₄(5) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol)、DiSBAC₂(3) (Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol)、di-4-ANNEPS、DiOC₆(3) (dihexaoxacarbocyanine iodide)、オクソールVなど)のいずれかを含んでいることが好ましい。

【0165】

本発明の塩基種判別用試薬キットは、さらに別の好ましい実施形態において、第二の塩基種判別用プライマーをさらに含み、上記第二の塩基種判別用プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が上記第一の塩基種判別用プライマーがハイブリダイズする場合と同じ側の鎖の上記置換領域に対応するように、上記標的核酸にハイブリダイズすることが可能な第二の一本鎖核酸からなり、上記第二の一本鎖核酸は、上記標的核酸の上記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかに相補的である塩基であって、かつ上記第一の上記一本鎖核酸の上記置換対応領域の上記塩基とは異なる塩基からなる3'末端に位置する第二の置換対応領域と、上記第二の置換対応領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して非相補的な少なくとも2つの塩基からなる第二の非相補領域と、上記第二の非相補領域の5'側に隣接し、かつ上記標的核酸に対して相補的な第二の相補領域であって、少なくとも上記標的核酸の上記置換領域の塩基と上記第二の置換対応領域の塩基とが互いに相補的な場合に、当該第二の一本鎖核酸が上記プライマー伸長反応の可能な条件下で上記標的核酸にハイブリダイズするのに十分な数の塩基からなる第二の相補領域とからなることを特徴とする。上記第二の置換対応領域は、一塩基からなることが最も好ましく、上記第二の非相補領域は、二塩基からなることが最も好ましく、そして上記第二の相補領域は、5以上の塩基からなることが好ましい。

【0166】

上記第一の一本鎖核酸と、上記第二の一本鎖核酸とは、長さが互いに異なることが好ましい。それによって、増幅された塩基配列がどちらのプライマーに由来するものかを容易に判断することが可能となるからである。同様の理由から、上記第一の一本鎖核酸と、上記第二の一本鎖核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされていることが好ましい。そのような互いに蛍光波長が異なる標識の例としては、Cy3（登録商標）(Amersham

Life Science, Inc.) および Cy 5 (登録商標) (Amersham Life Science, Inc.) の組み合わせ、あるいは JOE (550 nm に発光ピークを有する)、ROX (600 nm に発光ピークを有する)、FAM (520 nm に発光ピークを有する)、および TAMRA (580 nm に発光ピークを有する) の中から選択されるいずれかの標識の任意の組み合わせなどが挙げられる。これらの標識試薬は、例えば、Invitrogen (登録商標) やフナコシ株式会社などの当業者に周知の供給業者から市販品として容易に入手可能である。

【0167】

好ましくは、本発明の塩基種判別用試薬キットは、試薬の使用方法、手順その他の注意事項を示した指示書をさらに含んでいてもよい。

(実施例1)

【0168】

実施例1では、ヒトの血液より抽出したゲノムDNA溶液を用いて、ADH2遺伝子中に見られるSNPのタイピングを試みた。本実施例において解析対象としたSNP部位およびその周辺のゲノムDNAの塩基配列を配列番号10に示す。SNP部位は、配列番号10の46番目の塩基 (rで記された部位) であり、AあるいはGの可能性がある。このとき、考えられるSNPパターンはA/Aのホモ、G/Gのホモ、そしてA/Gのヘテロの3通りである。

【0169】

まず、上記のSNPパターンがそれぞれA/A、A/G、G/Gであることが予め分かっている3人の被験者の血液から、Genとるくん (登録商標) (血液用) (宝酒造 (株) 製) を用いて、SNPパターンがA/AのゲノムDNA (以下、A/AゲノムDNAと記す)、SNPパターンがA/GのゲノムDNA (以下、A/GゲノムDNAと記す)、SNPパターンがG/GのゲノムDNA (以下、G/GゲノムDNAと記す) を抽出した。

【0170】

次に、配列番号11および12に示した2種類のタイピングプライマーと、配列番号13に示した1種類のリバースプライマーとを用いてPCR反応液1~6を調製しPCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表2~7に記す通りである。また、PCR反応の条件は、図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は20回である。

【0171】

【表2】

PCR反応液1:

| 内容物 (反応) | 体積 |
|---------------------------|--------|
| A/AゲノムDNA (100ng/μl) | 1μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1μl |
| 10×PCR buffer | 2μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6μl |
| 配列番号11のタイピングプライマー1 (20μM) | 0.9μl |
| 配列番号13のリバースプライマー (20μM) | 0.9μl |
| 蒸留水 | 13.5μl |

【0172】

【表3】

PCR反応液2：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------|---------|
| A/AゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号12のタイピングプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0173】

【表4】

PCR反応液3：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------|---------|
| A/GゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号11のタイピングプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0174】

【表5】

PCR反応液4：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------|---------|
| A/GゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号12のタイピングプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0175】

【表6】

PCR反応液5：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------|---------|
| G/GゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号11のタイピングプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0176】

【表7】

PCR反応液6：

| 内容物（反応） | 体積 |
|--------------------------|---------|
| G/GゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号12のタイピングプライマー (20μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー (20μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0177】

上記PCR反応後、3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

【0178】

目的のDNA断片の増幅が認められたのは、PCR反応液1、3、4、6であった。一方、PCR反応液2および5に関してはほとんど増幅は確認されなかった。つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11のタイピングプライマーを用いたときにのみ増幅が確認された。逆に、G/GゲノムDNAに関して、配列番号12のタイピングプライマーを用いたときにのみ増幅が確認された。また、A/GゲノムDNAに関して、いずれのタイピングプライマーを用いた場合にも増幅が確認された。

【0179】

従って、上記の配列番号11および12のタイピングプライマーを用いることによって、SNP部位の塩基を判別できることが確認できた。

【0180】

また、DNA断片の増幅量は、PCR反応液1および6がほぼ同程度であり、PCR反応液3および4は、PCR反応液1および6に比べ明らかに少ないという結果であった。このように、PCR反応液1および3では、同じタイピングプライマーが用いられているにも関わらず、DNA断片の増幅量に明らかな差が認められるのは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAであるゲノムDNAの量がPCR反応液1の方がPCR反応液3の2倍であるからである。

【0181】

この結果は、DNA断片の増幅量の差からも、ゲノムDNAのSNPパターンがホモであるかヘテロであるかを解析することが可能であることを示している。従って、本実施例において、仮に配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれか一方のみを用いたとしても、DNA断片の増幅の有無だけでなく、増幅量も解析することによって、A/A、A/G、G/Gの三種類のSNPパターンをタイピングすることが可能である。このような増幅量に基づく定量的なSNPパターンの解析は、プライマー伸長反応が進む場合と進まない場合との区別が明確な本発明のタイピングプライマーにより、初めて可能となる。

【0182】

以上の結果は、本発明のタイピングプライマーを用いることでSNPタイピングができることを示している。

(実施例2)

【0183】

本実施例では、上記実施例1と同じゲノムDNAを解析対象とし、異なる長さの2種類のタイピングプライマーを用いてSNPタイピングを試みた。解析するSNP部位は上記実施例1と同じである。

【0184】

本実施例では、タイピングプライマーとして、実施例1で用いた配列番号11のタイピングプライマー1の5'末端が6FAMで標識されたタイピングプライマー（以下、標識プライマーCと記す）、配列番号14に示すオリゴヌクレオチドの5'末端が6FAMで標識されたタイピングプライマー（以下、標識プライマーDと記す）、および配列番号1

5に示したリバースプライマーのそれぞれについて、プライマー溶液（各20 μ M）を調製した。

【0185】

ここで、標識プライマーCと、配列番号15に示したリバースプライマーとの両プライマーからPCRによって増幅されるDNA断片の全長は60bpとなる。一方、標識プライマーDと配列番号15に示したリバースプライマーとの両プライマーからPCRによって増幅されるDNA断片の全長は62bpとなる。

【0186】

次に、標識プライマーCおよびDと、配列番号15に示したリバースプライマーとを用いてPCR反応液7～9を調製しPCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表8～10に記す通りである。また、PCR反応の条件は、実施例1と同様に、図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は20回である。

【0187】

【表8】

PCR反応液7：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|------------------------------|--------------|
| A/AゲノムDNA（100ng/ μ l） | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 標識プライマーC（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 標識プライマーD（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 配列番号15のリバースプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 12.6 μ l |

【0188】

【表9】

PCR反応液8：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|------------------------------|--------------|
| A/GゲノムDNA（100ng/ μ l） | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 標識プライマーC（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 標識プライマーD（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 配列番号15のリバースプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 12.6 μ l |

【0189】

【表10】

PCR反応液9：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|------------------------------|--------------|
| G/GゲノムDNA（100ng/ μ l） | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 標識プライマーC（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 標識プライマーD（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 配列番号15のリバースプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 12.6 μ l |

【0190】

上記PCR反応後、各PCR反応液についてジェネティックアナライザ ABI PR I

SM310（アプライドバイオシステムズジャパン（株）製）により解析を行った。

【0191】

その結果、PCR反応液7については60bpからなるDNA断片が優位に増幅されたことを示すピークが認められたのに対し、62bpからなるDNA断片の増幅を示すピークはほとんど認められなかった。逆に、PCR反応液9に関しては62bpからなる塩基配列の増幅を示すピークが認められたが、60bpからなる塩基配列の増幅を示すピークはほとんど認められなかった。一方、PCR反応液8に関しては60bpからなる塩基配列と62bpからなる塩基配列の両方のピークが確認された。

【0192】

従って、上記標識プライマーCおよびDを用いることによって、本実施例におけるSNP部位についてA/A、A/G、G/Gの三種類のSNPパターンを正確にタイピングすることが可能であることが確認された。

（実施例3）

【0193】

本実施例では、上記実施例1と同じゲノムDNAおよびタイピングプライマーを用いてPCR反応を行った後に、そのPCR反応液中のピロリン酸量をルシフェラーゼ反応を用いて解析することによって、SNP部位の塩基種のタイピングを行なうことを試みた。

【0194】

そこでまず、実施例1と同様にPCR反応液1～6を調製しPCR反応を行った。

【0195】

次に、PCR後の各PCR反応液中に含まれているピロリン酸量について、Mostafa Ronaghiらの方法（Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science, 281, 363-365.）に準じて解析した。ルシフェラーゼ反応による発光強度の解析については、AQUACOSMOS/VIMシステム（浜松ホトニクス（株）製）を用いて行った。その結果を図12に示す。

【0196】

図12では、PCR反応液1の場合の発光強度を100%とし、他の各PCR反応液の発光強度を、PCR反応液1の場合に対する割合（＝（各PCR反応液の発光強度／PCR反応液1の発光強度）×100）で表している。

【0197】

図12に示すように、PCR反応液1と6とが、ほぼ同等の発光強度を示すことが認められた。またPCR反応液3および4についてもほぼ同等の発光強度が認められたが、PCR反応液1および6と比較すると、明らかにその発光強度は小さかった。また、PCR反応液2および5に関してはほとんど発光は認められなかった。

【0198】

つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められ、逆にG/GゲノムDNAに関して、配列番号12のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められた。一方、A/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても発光が認められたものの、その強度は上記の2パターンの場合に比べ明らかに小さいものであった。

【0199】

従って、本実施例において、上記タイピングプライマーを用いてPCR反応およびルシフェラーゼ反応を介してその発光の有無を解析することで解析対象SNP部位のタイピングをすることができた。

【0200】

また、上記のようにA/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12のタイピングプライマーを用いた場合の発光強度が、A/AゲノムDNAに関して配列番号11のタ

イピングプライマーを用いた場合や、G/GゲノムDNAに関して配列番号12のタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、A/AゲノムDNAおよびG/GゲノムDNAでは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAまたはGであるゲノムDNAの量が、A/GゲノムDNAの2倍であるからである。

【0201】

従って、発光の有無だけではなく、発光強度の定量的な解析を行なうことによって、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれかを一方のみを用いた場合でも、SNPタイピングが可能であることが確認できた。このような定量的な解析によるSNPパターンがホモかヘテロかの判別は、プライマー伸長反応が進行する場合としない場合とを、明確に区別することができる本発明により、初めて有利に実行可能となる。

（実施例4）

【0202】

本実施例では、ヒトの血液より抽出したゲノムDNA溶液を用いて、Carbohydrate sulfotransferase 2 遺伝子中に見られるSNPのタイピングを試みた。本実施例において、解析対象としたSNP部位およびその周辺のゲノムDNAの塩基配列を配列番号16に示す。SNP部位は、配列番号16の37番目の塩基（sで記された部位）であり、GあるいはCの可能性がある。

【0203】

まず、上記のSNPパターンがそれぞれG/G、G/C、C/Cであることが予め分かっている3人の被験者の血液から、Genとるくん（登録商標）（血液用）（宝酒造（株）製）を用いて、SNPパターンがG/GのゲノムDNA（以下、G/GゲノムDNAと記す）、SNPパターンがG/CのゲノムDNA（以下、G/CゲノムDNAと記す）、SNPパターンがC/CのゲノムDNA（以下、C/CゲノムDNAと記す）を抽出した。

【0204】

次に、配列番号17に示したプライマーと、配列番号18に示したリバースプライマーとを用いてPCR反応液10～12を調製しPCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表11～13に示す通りである。また、PCR反応の条件は、図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は35回である。

【0205】

【表11】

PCR反応液10：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|------------------------|--------|
| G/GゲノムDNA（100ng/μl） | 1μl |
| TaKaRa Taq™（5U/μl） | 0.1μl |
| 10×PCR buffer | 2μl |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6μl |
| 配列番号17のプライマー（20μM） | 0.9μl |
| 配列番号18のリバースプライマー（20μM） | 0.9μl |
| 蒸留水 | 13.5μl |

【0206】

【表12】

PCR反応液11:

| 内容物 (濃度) | 体積 |
|--------------------------|---------|
| G/CゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号17のプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号18のリバースプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0207】

【表13】

PCR反応液12:

| 内容物 (濃度) | 体積 |
|--------------------------|---------|
| C/CゲノムDNA (100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号17のプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号18のリバースプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0208】

次に、上記PCR反応後のPCR反応液10～12のそれぞれを、SUPREC（登録商標）-PCR（宝酒造（株）製）を用いて精製した。これらについて、配列番号19および20に示したタイピングプライマーを用いてプライマー伸長反応液1～6を調製し、プライマー伸長反応を行った。各プライマー伸長反応液の組成は表14～19に示す通りである。また、プライマー伸長反応の条件は、図13に示すとおりである。

【0209】

【表14】

プライマー伸長反応液1:

| 内容物 (濃度) | 体積 |
|---------------------------|--------|
| 精製済みPCR反応液10 | 10 μl |
| プラチナTaq DNAポリメラーゼ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer、Minus Mg | 2 μl |
| MgCl ₂ (50mM) | 0.8 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号19のタイピングプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 4.6 μl |

【0210】

【表15】

プライマー伸長反応液2:

| 内容物 (濃度) | 体積 |
|---------------------------|--------|
| 精製済みPCR反応液10 | 10 μl |
| プラチナTaq DNAポリメラーゼ (5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer、Minus Mg | 2 μl |
| MgCl ₂ (50mM) | 0.8 μl |
| dNTPs (2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号20のタイピングプライマー (20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 4.6 μl |

【0211】

【表16】

プライマー伸長反応液3：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------------|-------------|
| 精製済みPCR反応液11 | 10 μ l |
| プラチナTaqDNAポリメラーゼ（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10 \times PCR buffer、Minus Mg | 2 μ l |
| MgCl ₂ （50mM） | 0.8 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 配列番号19のタイピングプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 4.6 μ l |

【0212】

【表17】

プライマー伸長反応液4：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------------|-------------|
| 精製済みPCR反応液11 | 10 μ l |
| プラチナTaqDNAポリメラーゼ（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10 \times PCR buffer、Minus Mg | 2 μ l |
| MgCl ₂ （50mM） | 0.8 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 配列番号20のタイピングプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 4.6 μ l |

【0213】

【表18】

プライマー伸長反応液5：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------------|-------------|
| 精製済みPCR反応液12 | 10 μ l |
| プラチナTaqDNAポリメラーゼ（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10 \times PCR buffer、Minus Mg | 2 μ l |
| MgCl ₂ （50mM） | 0.8 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 配列番号19のタイピングプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 4.6 μ l |

【0214】

【表19】

プライマー伸長反応液6：

| 内容物（濃度） | 体積 |
|---------------------------------|-------------|
| 精製済みPCR反応液12 | 10 μ l |
| プラチナTaqDNAポリメラーゼ（5U/ μ l） | 0.1 μ l |
| 10 \times PCR buffer、Minus Mg | 2 μ l |
| MgCl ₂ （50mM） | 0.8 μ l |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 μ l |
| 配列番号20のタイピングプライマー（20 μ M） | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 4.6 μ l |

【0215】

プライマー伸長反応後、各プライマー伸長反応液中に含まれているピロリン酸量について、実施例3と同様にルシフェラーゼ反応を介して解析した。その結果を図14に示す。

【0216】

図14では、プライマー伸長反応液1の場合の発光強度を100%とし、他の各プライマー伸長反応液の発光強度を、プライマー伸長反応液1の場合に対する割合（＝（各プライマー伸長反応液の発光強度／プライマー伸長反応液1の発光強度） \times 100）で表している。

【0217】

図14に示すように、プライマー伸長反応液1と6とが、ほぼ同等の発光強度を示すことが認められた。またプライマー伸長反応液3および4についてもほぼ同等の発光強度が認められたが、プライマー伸長反応液1および6と比較すると、明らかにその発光強度は小さかった。また、プライマー伸長反応液2および5に関してはほとんど発光は認められなかった。

【0218】

つまり、G/GゲノムDNAに関して、配列番号19のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められ、逆にC/CゲノムDNAに関して、配列番号20のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められた。一方、G/CゲノムDNAに関して、配列番号19および20のタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても発光が認められたものの、その強度は上記の二パターンの場合に比べ明らかに小さいものであった。

【0219】

従って、本実施例において、上記タイピングプライマーを用いてプライマー伸長反応およびルシフェラーゼ反応を介してその発光の有無を解析することで解析対象SNP部位のタイピングをすることができた。

【0220】

また、上記のようにG/CゲノムDNAに関して、配列番号19および20のタイピングプライマーを用いた場合の発光強度が、G/GゲノムDNAに関して配列番号19のタイピングプライマーを用いた場合や、C/CゲノムDNAに関して配列番号20のタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、G/GゲノムDNAおよびC/CゲノムDNAでは、プライマー伸長反応液における鋳型となるSNP部位の塩基がGまたはCであるゲノムDNAの量が、G/CゲノムDNAの2倍であるからである。

【0221】

従って、発光の有無だけではなく、発光強度の定量的な解析を行なうことによって、配列番号19および20のタイピングプライマーのいずれかを一方のみを用いた場合でも、SNPタイピングが可能であることが確認できた。このような定量的な解析によるSNPパターンがホモかヘテロかの判別は、プライマー伸長反応が進行する場合としない場合とを、明確に区別することができる本発明により、初めて有利に実行可能となる。

(実施例5)

【0222】

本実施例5では、実施例1と同じゲノムDNAおよびプライマーを用いてPCR反応を行った後に、そのPCR反応液中のピロリン酸を H^+ -ピロホスファターゼを用いて解析することで実施例1と同じ解析対象SNP部位のタイピングを行なうことを試みた。

【0223】

図15は、 H^+ -ピロホスファターゼを模式的に表す図である。

【0224】

図15に示すように、 H^+ -ピロホスファターゼは通常、植物の液胞膜内に存在する膜タンパク質であり、1分子のピロリン酸から2分子のリン酸を生成する加水分解反応に伴って、液胞膜の外側から液胞膜の内側に向け H^+ を輸送する性質を有する。このため、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応によって、液胞膜の内部では H^+ 濃度が増大し、液胞膜の外部では H^+ 濃度が減少する。すなわち、ピロリン酸を測定するには、ピロリン酸の測定を行いたい試料液を植物細胞等から単離してきた液胞膜に内在している状態の H^+ -ピロホスファターゼに接触させ、その後、液胞膜の内側あるいは液胞膜の外側の H^+ 濃度変化を測定すればよい。このとき、 H^+ -ピロホスファターゼは必ずしも細胞から単離された液胞膜に結合した状態のままで用いられる必要はない。例えば、液胞膜より H^+ -ピロホスファターゼを単離した後、人工的に形成した脂質二重層膜などの H^+ をほとんど通さない膜中に H^+ -ピロホスファターゼを再構築して用いてもよい。なお、上記の H^+ -

ピロホスファターゼを膜内に内包した天然または人工の液胞膜の抽出および／または作製は、当業者の通常の技術である。

【0225】

H⁺濃度の変化を測定する方法としては、代表的にはH⁺濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法と電氣的に測定する方法が挙げられる。H⁺濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法としては、pH試験紙、pH感受性色素（例えば、アクリジンオレンジなど）、膜電位感受性色素（例えば、DiBAC₄(3) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol)、DiBAC₄(5) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol;)、DiSBAC₂(3) (Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol)、di-4-ANNEPS、DiOC₆(3) (dihexaoxacarbocyanine iodide)、オクソールVなど）等を用いる方法が挙げられる。電氣的に測定する方法としては、金属電極法（水素電極法、キンヒドロソニ電極法、アンチモン電極法がある）、ガラス電極法、ISFET電極法、パッチクランプ法、LAPS法 (Light-Addressable Potentiometric Sensor) 等が挙げられる。これらH⁺濃度の変化を測定する方法と、上記のH⁺-ピロホスファターゼの反応を併用することによって、試料液中のピロリン酸を光学的シグナルあるいは電氣的シグナルに変換して測定することができる。なおH⁺濃度変化を解析する方法としては、上記H⁺濃度変化解析方法に限られることはなく、他の解析方法であってもH⁺濃度変化を解析し得るのであればよい。

【0226】

そこで本実施例においては、Shizuo Yoshida等の方法 (Masayoshi Maeshima and Shizuo Yoshida, (1989), J. Biol. Chem. 264 (33), p20068-20073) に準じて以下に示すようにヤエナリ由来の液胞膜からなるH⁺-ピロホスファターゼ液を調製した。

【0227】

まず、ヤエナリ由来の液胞膜小胞体をTris/Mes（濃度5mM、pH7.0）、sorbitol（濃度0.25M）、DTT（濃度2mM）からなる溶液中に溶解し、液胞膜からなる膜小胞の懸濁液とした。

【0228】

次に、この懸濁液を、MgSO₄（濃度1mM）、KCl（濃度50mM）、sorbitol（濃度0.25M）、アクリジンオレンジ（pH感受性色素、3μM）、Hepes/Bristris propane（濃度25mM、pH7.2）からなる反応液中に混合し、H⁺-ピロホスファターゼ液とした。この様子を図16に模式的に示す。このとき、膜小胞にはH⁺-ピロホスファターゼが保持されており、膜小胞の内部および外部には一様にアクリジンオレンジが存在している。このH⁺-ピロホスファターゼ液を6本のチューブに均等に分注した。

【0229】

次に、上記実施例1と同様に、PCR反応を行なったPCR反応液1～6を上記ピロホスファターゼ液の入ったチューブにそれぞれ添加し、H⁺-ピロホスファターゼによる反応を開始した。

【0230】

本実施例においては、pH感受性色素としてアクリジンオレンジを使用している。アクリジンオレンジは液胞膜を透過可能であり、酸性条件下において蛍光を消光するという性質を有する。従って、上記H⁺-ピロホスファターゼ液に対してある一定量以上のピロリン酸を含む溶液を添加した場合、H⁺-ピロホスファターゼによるH⁺輸送が起こり、膜小胞内は酸性になる。このためアクリジンオレンジによる蛍光は失われる。この性質を利用して、PCR反応によって生じるピロリン酸を定量することができる。

【0231】

本実施例では、各PCR反応液を添加する前後のアクリジンオレンジの蛍光強度（励起光：493nm、蛍光：540nm）の変化を解析した。その結果を図18に示す。

【0232】

図18は、上記各PCR反応液それぞれの場合における、540nmの蛍光強度の変化を表すグラフである。ここでは、540nmの蛍光強度の変化を、上記各PCR反応液の添加1秒後における単位秒当たりの消光率で表している。なお、図10では、PCR反応液1の場合における単位秒当たりの消光率を100%として、各PCR反応液における単位秒当たりの消光率を換算している。

【0233】

これよりPCR反応液1と6がほぼ同等の消光率を示すことが分かる。またPCR反応液3および4についてもほぼ同等の消光率が認められたが1や6と比較すると明らかにその消光率は小さかった。またPCR反応液2および5に関してはほとんど消光は認められなかった。

【0234】

つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11に示すタイピングプライマーを用いたときだけ消光が認められ、逆にG/GゲノムDNAに関して、配列番号12に示すタイピングプライマーを用いたときだけ消光が認められた。一方、A/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12に示すタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても消光が認められたものの、その消光率は上記の2パターンの場合に比べて明らかに小さいものであった。

【0235】

従って、本実施例において、配列番号11および12に示すタイピングプライマーを用いたPCR反応を行ない、それらについてH⁺-ピロホスファターゼによる反応を利用して解析することでSNP部位のタイピングをすることができた。また上記のようにA/GゲノムDNAに関して、配列番号11または12に示すタイピングプライマーを用いた場合の消光率が、A/AゲノムDNAに関して配列番号11に示すタイピングプライマーを用いた場合や、G/GゲノムDNAに関して配列番号12に示すタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、A/AゲノムDNAおよびG/GゲノムDNAでは、PCR反応における鋳型となるゲノムDNAのSNP部位の塩基がAまたはGであるゲノムDNAの量が、A/GゲノムDNAの2倍であるからである。

【0236】

従って、消光の有無だけではなく、消光率の定量的な解析を行うことによって、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれか一方のみの場合でも、SNPタイピングを行なうことができる。このような定量的な解析によるSNPパターンのホモかヘテロかの判別は、プライマー伸長反応が進行する場合としない場合とを、明確に区別することができる本発明により、初めて有利に実行可能となる。

(実施例6)

【0237】

本実施例6では、実施例1と同じゲノムDNAおよびプライマーを用いてPCR反応を行った後に、そのPCR反応液中のピロリン酸をピロホスファターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼの3種類の酵素を用いて解析することで実施例1と同じ解析対象SNP部位のタイピングを行なうことを試みた。

【0238】

この方法では、まず、この反応を触媒する酵素であるピロホスファターゼを用いて、ピロリン酸を加水分解して無機リン酸にする。

【0239】

次に、無機リン酸は、グリセルアルデヒド3-リン酸および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドとともに、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの触媒作用を受け、1,3-ビスホスホグリセリン酸および還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドに変換される。

【0240】

次に、生成された還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドが、ジアホラーゼの触

媒作用を受けて、電子メディエータ（例えば、フェリシアン化物、1, 2-ナフトキノ-4-スルホン酸、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、メルドラブルー等）の酸化体とともに反応し、再び酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドに酸化する。この際、電子メディエータの酸化体は還元され、還元体となる。これらの電子メディエータは、当業者に周知のものであり、市販品として容易に入手可能である。

【0241】

最後に、生成された電子メディエータの還元体が、一定以上の電位が印加された作用極において電気化学的に酸化される。この酸化により、電子が放出され、このような電子の放出は、電流値として示され得る。このような電流の測定は、一般の電気化学的検出器を用いてなされ得る。好ましい電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウム等を使用することができる。

【0242】

電流値は、最初のピロリン酸の存在に依存するので、この酸化電流値をもとにしてピロリン酸が検出され得る。

【0243】

以上を示される検出方法は、ピロリン酸の電気化学的な手法による検出を可能にする。その結果得られる電流値はまた最初のピロリン酸の量に依存するため、その検出は定量的なものである。

【0244】

そこで、本実施例では、まず以下の手順で反応溶液を作製した。30 mMグリセルアルデヒド3-リン酸17.5 μ l（終濃度1 mM）、10 mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（酸化型）50 μ l（終濃度1 mM）、10 mMフェリシアン化カリウム50 μ l（終濃度1 mM）、100 mM塩化マグネシウム8 μ l（終濃度1.6 mM）、1000 unit/ml ジアホラーゼ5 μ l（終濃度10 unit/ml）および200 unit/ml ピロフォスファターゼ1 μ l（終濃度0.4 unit/ml）、を50 mM Tricine-NaOH緩衝液に溶解し、pH 8.8に調整して総量を400 μ lとした。さらに上記実施例1と同様に、PCR反応を行なったPCR反応液1～6を50 μ lずつ上記容器にそれぞれ添加し、反応溶液を作製した。このようにして作製した反応溶液を図19に示すように構成した測定装置系中に供した。本測定装置系は、次のような構成である。ガラスセル106を、内部に攪拌子107を入れて、スタラーマシン113上に固定した。ガラスセル106に、電極固定器具108により、測定極109、対極110、および参照極111をセットした。測定極109は直径1.6 mmの金電極で、また対極110は白金線でそれぞれ構成した。参照極111は、銀/塩化銀電極で構成し、表面に塩化銀がコートされた銀線と飽和KCl溶液とを多孔性ガラスを介してガラスセルに接続した。これらの電極を、それぞれ電気化学測定システム（北斗電工製；図中、114で示される）に接続して、パソコン115で制御およびデータの記録を行った。上記ガラスセル106中に、上記の反応溶液を満たした。この反応溶液を攪拌子によって攪拌した。電気化学測定システムを用いて、参照極111に対して+600 mVの電位を測定極109に印加した。電圧印加と同時に測定を開始し、その後に800 unit/mlグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ20 μ l（終濃度32 unit/ml）を加えることにより反応が開始させた。これにより、反応溶液中のメディエータが酸化し、この酸化による電子の放出により測定極109と対極110との間に流れた電流値を電気化学測定システムを用いて測定した。60秒後の電流値を図20に示す。

【0245】

図20に示すように、PCR反応液1と6とが、ほぼ同等の電流値を示すことが認められた。またPCR反応液3および4についてもほぼ同等の電流値が認められたが、PCR反応液1および6と比較すると、明らかにその電流値は小さかった。また、PCR反応液2および5に関してはさらに電流値は低かった。

【0246】

つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11のタイピングプライマーを用いたときだけ酸化電流が認められ、逆にG/GゲノムDNAに関して、配列番号12のタイピングプライマーを用いたときだけ酸化電流が認められた。一方、A/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても電流が認められたものの、その電流値は上記の二パターンの場合に比べ明らかに小さいものであった。

【0247】

従って、本実施例において、上記タイピングプライマーを用いてPCR反応およびそのPCR反応液中のピロリン酸をピロホスファターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼの3種類の酵素を用いて解析することで解析対象SNP部位のタイピングをすることができた。

【0248】

また、上記のようにA/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12のタイピングプライマーを用いた場合の電流値が、A/AゲノムDNAに関して配列番号11のタイピングプライマーを用いた場合や、G/GゲノムDNAに関して配列番号12のタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、A/AゲノムDNAおよびG/GゲノムDNAでは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAまたはGであるゲノムDNAの量が、A/GゲノムDNAの2倍であるからである。

【0249】

従って、電流値の定量的な解析を行なうことによって、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれかを一方のみを用いた場合でも、SNPタイピングが可能であることが確認できた。このような定量的な解析によるSNPパターンがホモかヘテロかの判別は、プライマー伸長反応が進行する場合としない場合とを、明確に区別することができる本発明により、初めて有利に実行可能となる。

(実施例7)

【0250】

実施例7では、実施例1と同じSNP部位を解析対象とし、まず配列番号21と13に示す二種類のプライマーによって解析対象SNPを含む領域をPCRによって増幅させた後、配列番号11および12に示したタイピングプライマーと、配列番号13に示したリバースプライマーによってタイピングを試みた。

【0251】

すなわちまず、実施例1と同じくSNPパターンがそれぞれA/A、A/G、G/Gであることが予め分かっている3人の被験者の血液から、Genとるくん（登録商標）（血液用）（宝酒造（株）製）を用いて、A/AゲノムDNA、A/GゲノムDNA、G/GゲノムDNAを抽出した。

【0252】

次に、配列番号21および13に示したプライマーを用いてPCR反応液13～15を調製しPCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表20～22に記すとおりである。また、PCR反応の条件は、図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は40回である。

【0253】

次に、上記PCR反応後のPCR反応液13～15のそれぞれを1000倍に希釈したのについて、配列番号11および12のタイピングプライマーと配列番号13に示したリバースプライマーを用いてPCR反応液16～21を調製し、PCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表23～28に記すとおりである。また、PCR反応の条件は図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は20回である。

【0254】

【表20】

PCR反応液13:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------|---------|
| A/AゲノムDNA(100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™(5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号21のプライマー(20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0255】

【表21】

PCR反応液14:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------|---------|
| A/GゲノムDNA(100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™(5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号21のプライマー(20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0256】

【表22】

PCR反応液15:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------|---------|
| A/AゲノムDNA(100ng/μl) | 1 μl |
| TaKaRa Taq™(5U/μl) | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μl |
| 配列番号21のプライマー(20 μM) | 0.9 μl |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μM) | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 13.5 μl |

【0257】

【表23】

PCR反応液16:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------------|--------------|
| PCR反応後のPCR反応液13を1000倍希釈したもの | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™(5U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μ l |
| 配列番号11のタイピングプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 13.5 μ l |

【0258】

【表24】

PCR反応液17:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------------|--------------|
| PCR反応後のPCR反応液13を1000倍希釈したもの | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™(5U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μ l |
| 配列番号12のタイピングプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 13.5 μ l |

【0259】

【表25】

PCR反応液18:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------------|--------------|
| PCR反応後のPCR反応液14を1000倍希釈したもの | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™(5U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μ l |
| 配列番号11のタイピングプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 13.5 μ l |

【0260】

【表26】

PCR反応液19:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------------|--------------|
| PCR反応後のPCR反応液14を1000倍希釈したもの | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™(5U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μ l |
| 配列番号12のタイピングプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 13.5 μ l |

【0261】

【表27】

PCR反応液20:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------------|--------------|
| PCR反応後のPCR反応液15を1000倍希釈したもの | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™(5U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μ l |
| 配列番号11のタイピングプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 13.5 μ l |

【0262】

【表28】

PCR反応液21:

| 内容物(濃度) | 体積 |
|-------------------------------|--------------|
| PCR反応後のPCR反応液15を1000倍希釈したもの | 1 μ l |
| TaKaRa Taq™(5U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 10×PCR buffer | 2 μ l |
| dNTPs(2.5mM) | 1.6 μ l |
| 配列番号12のタイピングプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 配列番号13のリバースプライマー(20 μ M) | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 13.5 μ l |

【0263】

上記PCR反応後、3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

【0264】

目的のDNA断片の増幅が認められたのは、PCR反応液16、18、19、21であった。一方、PCR反応液17および20に関してはほとんど増幅は確認されなかった。つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11のタイピングプライマーを用いたと

きにのみ増幅が確認された。逆に、G/GゲノムDNAに関して、配列番号12のタイピングプライマーを用いたときにのみ増幅が確認された。また、A/GゲノムDNAに関して、いずれのタイピングプライマーを用いた場合にも増幅が確認された。

【0265】

従って、上記の配列番号11および12のタイピングプライマーを用いることによって、SNP部位の塩基を判別できることが確認できた。

【0266】

また、DNA断片の増幅量は、PCR反応液16および21がほぼ同程度であり、PCR反応液18および19は、PCR反応液16および21に比べ明らかに少ないという結果であった。このように、PCR反応液16および18では、同じタイピングプライマーが用いられているにも関わらず、DNA断片の増幅量に明らかな差が認められるのは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAであるゲノムDNAの量がPCR反応液16の方がPCR反応液18の2倍であるからである。

【0267】

この結果は、DNA断片の増幅量の差からも、ゲノムDNAのSNPパターンがホモであるかヘテロであるかを解析することが可能であることを示している。従って、本実施例において、仮に配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれか一方のみを用いたとしても、DNA断片の増幅の有無だけでなく、増幅量も解析することによって、A/A、A/G、G/Gの三種類のSNPパターンをタイピングすることが可能である。このような増幅量に基づく定量的なSNPパターンの解析は、プライマー伸長反応が進む場合と進まない場合との区別が明確な本発明のタイピングプライマーにより、初めて可能となる。

【0268】

以上の結果は、本発明のタイピングプライマーを用いることでSNPタイピングができることを示している。

【0269】

本発明にかかる塩基種判別方法によれば、核酸中の所望の塩基の種類を正確かつ再現性良く判別することができ、医療機器や薬剤分野において有用である。

【0270】

以上、本発明を詳細に説明してきたが、前述の説明はあらゆる点において本発明の例示にすぎず、その範囲を限定しようとするものではない。本発明の範囲を逸脱することなく種々の改良や変形を行うことができることは言うまでもない。

クレーム

1. 標的核酸における一塩基の置換領域の塩基種を判別する方法であって、

(a) 一塩基の置換領域を有する二本鎖の標的核酸と、塩基種判別用プライマーと、DNAポリメラーゼと、dNTPsとを含む溶液を調製する工程と、

(b) 前記溶液中において、前記塩基種判別用プライマーを前記標的核酸にハイブリダイズさせ、前記塩基種判別用プライマーを始点とするプライマー伸長反応を進行させる工程と、

(c) 前記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することによって、前記置換領域の塩基種を判別する工程とを含み、

前記塩基種判別用プライマーは、前記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が前記標的核酸のいずれか一方の鎖の前記置換領域に対応するように当該一方の鎖にハイブリダイズすることが可能な第一の一本鎖核酸からなり、

当該第一の一本鎖核酸は、

前記標的核酸の前記一方の鎖の前記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である一塩基からなる3'末端に位置する置換対応領域と、

前記置換対応領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸の前記一方の鎖に対して非相補的な2つの塩基からなる非相補領域と、

前記非相補領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸の前記一方の鎖に対して相補的な5以上の塩基からなる相補領域とからなる、塩基種判別方法。

2. 請求項1に記載の塩基種判別方法において、

前記DNAポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いことを特徴とする塩基種判別方法。

3. 請求項1に記載の塩基種判別方法において、

前記第一の一本鎖核酸は、DNAであることを特徴とする塩基種判別方法。

4. 請求項1に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(a)では、前記溶液中に、前記二本鎖の標的核酸の他方の鎖にハイブリダイズ可能な一本鎖核酸からなるリバースプライマーをさらに含み、

前記工程(b)では、前記プライマー伸長反応を、PCR、SDA、RCR、LAMPおよびTMAからなる群から選択されるいずれか1つの塩基配列増幅方法を用いて進行させることを特徴とする塩基種判別方法。

5. 請求項4に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(c)では、前記プライマー伸長反応の進行の差に基づいて、前記置換領域の塩基種を判別することを特徴とする、塩基種判別方法。

6. 請求項4に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(c)では、前記塩基配列増幅方法によって増幅された塩基配列の増幅量を、電気泳動法、質量分析法、および液体クロマトグラフィーからなる群から選択されるいずれか1つの方法で測定することによって、前記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することを特徴とする、塩基種判別方法。

7. 請求項1に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(c)では、前記プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸の量を測定することによって、前記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することを特徴とする塩基種判別方法。

8. 請求項4に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(c)では、前記プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸の量を測定することによって、前記塩基配列増幅方法によって増幅された塩基配列の増幅量を測定することを特徴とする、塩基種判別方法。

9. 請求項4に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(c)では、前記塩基配列増幅法によって増幅された塩基配列の増幅量を定量的に解析することによって、前記置換領域の塩基種を判別することを特徴とする、塩基種判別方法。

10. 請求項7に記載の塩基種判別方法において、

前記ピロリン酸の量の測定は、

工程(b)からの前記溶液の少なくとも一部を含む試料中で、ピロリン酸を無機リン酸に変換する工程、

前記試料を、グリセルアルデヒド3-リン酸、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、および電子メディエータを含む測定系に供する工程、および、

前記測定系において、生成される電流値を測定する工程を包含し、

前記電流値が、前記試料中のピロリン酸の濃度を示すことを特徴とする塩基種判別方法。

11. 前記電子メディエータが、フェリシアン化物、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項10に記載の塩基種判別方法。

12. 前記測定系がジアホラーゼをさらに含む、請求項10に記載の塩基種判別方法。

13. 前記ピロリン酸の無機リン酸への変換は、前記試料中でピロリン酸をピロホスファターゼと反応させることによって行われる、請求項10に記載の塩基種判別方法。

14. 請求項7に記載の方法において、

前記ピロリン酸の量の測定は、

工程(b)からの前記溶液の少なくとも一部を含む試料を、 H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された少なくとも2つの領域を有する測定系の一方の領域に配置させる工程、および

前記測定系において、前記少なくとも2つの領域のいずれかにおいて H^+ 濃度の変化を測定する工程を包含し、

前記 H^+ 濃度の変化の程度が、前記試料中のピロリン酸の濃度を示すことを特徴とする、塩基種判別方法。

15. 請求項14に記載の方法において、

前記ピロリン酸の量の測定は、

工程(b)からの前記溶液の少なくとも一部を含む試料を、 H^+ -ピロホスファターゼを膜内に有する人工または天然の膜小胞を含む測定系に供する工程、および

前記測定系において、前記膜小胞内側または前記膜小胞外側における H^+ 濃度の変化を測定する工程を包含し、

前記 H^+ 濃度の変化の程度が、前記試料中のピロリン酸の濃度を示すことを特徴とする塩基種判別方法。

16. 前記 H^+ 濃度の変化の測定は、 H^+ 濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法または電氣的に測定する方法のいずれかによって行われる、請求項14に記載の塩基種判別方法。

17. 前記光学的変化に変換して測定する方法は、pH試験紙、pH感受性色素、または膜電位感受性色素を使用する、請求項16に記載の塩基種判別方法。

18. 前記電氣的に測定する方法は、金属電極法、ガラス電極法、ISFET電極法、パッチクランプ法、およびLAPS法からなる群から選択される方法である、請求項16に記載の塩基種判別方法。

19. 前記光学的変化に変換して測定する方法では、前記膜小胞内側の H^+ 濃度の変化を、pH感受性色素を用いて測定する、請求項17に記載の塩基種判別方法。

20. 請求項1に記載の塩基種判別方法において、

前記工程(a)では、前記溶液中に、第二の塩基種判別用プライマーをさらに含み、

前記第二の塩基種判別用プライマーは、前記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が前記第一の塩基種判別用プライマーがハイブリダイズする場合と同じ側の鎖の前記置換領域に対応するように、前記標的核酸の前記鎖にハイブリダイズすることが可能な第二の一本鎖核酸からなり、

当該第二の一本鎖核酸は、

前記標的核酸の前記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である一塩基であって、かつ前記第一の前記一本鎖核酸の前記置換対応領域の前記塩基とは異なる一塩基からなる3'末端に位置する第二の置換対応領域と、

前記第二の置換対応領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸の前記鎖に対して非相補的な2つの塩基からなる第二の非相補領域と、

前記第二の非相補領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸の前記鎖に対して相補的な5以上の塩基からなる第二の相補領域とからなる、塩基種判別方法。

21. 請求項20に記載の塩基種判別方法において、

前記第一の一本鎖核酸と、前記第二の一本鎖核酸とは、長さが互いに異なることを特徴とする塩基種判別方法。

22. 請求項20に記載の塩基種判別方法において、

前記第一の一本鎖核酸と、前記第二の一本鎖核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされていることを特徴とする塩基種判別方法。

23. 標的核酸の一塩基の置換領域の塩基種を判別するためのプライマーであって、

前記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が前記標的核酸の前記置換領域に対応するように、当該標的核酸にハイブリダイズすることが可能な一本鎖核酸からなり、

当該一本鎖核酸は、

前記標的核酸の前記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である一塩基からなる3'末端に位置する置換対応領域と、

前記置換対応領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して非相補的な2つの塩基からなる非相補領域と、

前記非相補領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して相補的な5以上の塩基からなる相補領域とを含む、塩基種判別用プライマー。

24. 塩基種判別用プライマーと、DNAポリメラーゼと、dNTPsとを含む、標的核

酸における一塩基の置換領域の塩基種を判別するための塩基種判別用試薬キットであって、

前記プライマーは、前記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が前記標的核酸の前記置換領域に対応するように、当該標的核酸にハイブリダイズすることが可能な一本鎖核酸からなり、

当該一本鎖核酸は、

前記標的核酸の前記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である一塩基からなる3'末端に位置する置換対応領域と、

前記置換対応領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して非相補的な2つの塩基からなる非相補領域と、

前記非相補領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して相補的な5以上の塩基からなる相補領域とを含む、塩基種判別用試薬キット。

25. 前記DNAポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いことを特徴とする、請求項24に記載の塩基種判別用試薬キット。

26. 前記一本鎖核酸はDNAである、請求項24に記載の塩基種判別用試薬キット。

27. リバースプライマーをさらに含む、請求項24に記載の塩基種判別用試薬キット。

28. ピロホスファターゼをさらに含む、請求項24に記載の塩基種判別用試薬キット。

29. グリセルアルデヒド3-リン酸、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、および電子メディエータをさらに含む、請求項28に記載の塩基種判別用試薬キット。

30. ジアホラーゼをさらに含む、請求項29に記載の塩基種判別用試薬キット。

31. 前記電子メディエータが、フェリシアン化物、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項29に記載の塩基種判別用試薬キット。

32. H⁺-ピロホスファターゼをさらに含む、請求項24に記載の塩基種判別用試薬キット。

33. pH試験紙、pH感受性色素、または膜電位感受性色素のいずれかをさらに含む、請求項32に記載の塩基種判別用試薬キット。

34. 請求項24に記載の塩基種判別用試薬キットにおいて、

第二の塩基種判別用プライマーをさらに含み、

前記第二の塩基種判別用プライマーは、上記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が前記第一の塩基種判別用プライマーがハイブリダイズする場合と同じ側の鎖の前記置換領域に対応するように、前記標的核酸にハイブリダイズすることが可能な第二の一本鎖核酸からなり、

前記第二の一本鎖核酸は、

前記標的核酸の前記置換領域の予想され得る塩基種のいずれかと相補的である一塩基であって、かつ前記第一の前記一本鎖核酸の前記置換対応領域の前記塩基とは異なる一塩基からなる3'末端に位置する第二の置換対応領域と、

前記第二の置換対応領域の 5' 側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して非相補的な 2 つの塩基からなる第二の非相補領域と、

前記第二の非相補領域の 5' 側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して相補的な 5 以上の塩基からなる第二の相補領域とからなることを特徴とする、塩基種判別用試薬キット。

35. 前記第一の一本鎖核酸と、前記第二の一本鎖核酸とは、長さが互いに異なることを特徴とする、請求項 34 に記載の塩基種判別用試薬キット。

36. 前記第一の一本鎖核酸と、前記第二の一本鎖核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされていることを特徴とする、請求項 34 に記載の塩基種判別用試薬キット。

開示の概要

標的核酸の一塩基の置換領域の塩基種を判別するためのプライマーであって、前記標的核酸にハイブリダイズする場合には、その3'末端が前記標的核酸の前記置換領域に対応するように、当該標的核酸にハイブリダイズすることが可能な一本鎖核酸からなり、当該一本鎖核酸は、3'末端に、前記標的核酸の前記置換領域の予想され得る塩基のいずれかと相補的である塩基からなる置換対応領域と、前記置換対応領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して非相補的な2つの塩基からなる非相補領域と、前記非相補領域の5'側に隣接し、かつ前記標的核酸に対して相補的な5以上の塩基からなる相補領域とを含む、塩基種判別用プライマー。